Aus der Neurochemischen Abteilung
der Psychiatrischen und Neurologischen Klinik und Poliklinik
der Freien Universität Berlin
Direktor: Prof. Dr. med. H. Helmut Selbach

ÜBER DEN STOFFWECHSEL DES 3-ACETYLPYRIDIN IN VITRO

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der
Medizinischen Fakultät der Freien Universität
Berlin

vorgelegt von
Werner Oesterle
aus Stuttgart

1966

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41535704_0055

Aus der Neurochemischen Abteilung der
Psychiatrischen und Neurologischen Klinik
und Poliklinik der Freien Universität Berlin
(Direktor: Professor Dr. med. Helmut Selbach)

ÜBER DEN STOFFWECHSEL DES 3-ACETYLPYRIDIN IN VITRO

INAUGURAL - DISSERTATION
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der
Medizinischen Fakultät der Freien Universität
Berlin

vorgelegt von
Werner Oesterle
aus Stuttgart

1. Dekan: Professor Dr. med. Wilhelm Masshoff

2. Referent: Priv.Doz. Dr. med. Karl Kanig

3. Coreferent: Professor Dr. med. Hans Herken

UNIVERSITEITSBIBLIOTHEEK - LEIDEN

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin.

Promoviert am: 23. 9. 1966

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

Seite

A : EINLEITUNG 4

B : ÜBERBLICK ÜBER DEN GEGENWÄRTIGEN STAND DER 3-ACETYLPYRIDIN-FORSCHUNG 6

I: 3-Acetylpyridin und Pyridin-3-methylcarbinol als Antivitamine 6

II: 3-Acetylpyridin und Pyridin-3-methylcarbinol als Provitamine 10

III: 3-Acetylpyridin als Hemmer der Nicotinamidase 12

C : METHODIK 14

I: Bestimmungsmethode 14

1. Anforderungen an das Trennverfahren 14
2. Papier-Chromatographie 15
3. Dünnschicht-Chromatographie 16
   a) Arbeitstechnik
   b) Dokumentation 18
   c) Qualitative Auswertung 19
   d) Quantitative Auswertung 20
   e) Wasserdampfflüchtigkeit der Pyridinbasen 22
   f) Schwierigkeiten bei der Dünnschicht-Chromatographie 23
4. Dünnschicht-Chromatographie von säurelöslichen Nucleotiden und Pyridinbasen gemeinsam 25
   a) An Kieselgel H 25
   b) An DEAE- und Ecteola-Zellulose 28
5. Dünnschicht-Chromatographie der Pyridinbasen 29
6. Dünnschicht-Hochspannungs-Elektrophorese 30

Seite

II: Art der Zellfraktionierung und Durchführung der In-vitro-Versuche 32

1. Gewebegewinnung und Zellfraktionierung 32
2. Versuchsablauf 33
3. Versuche mit hydrierenden Fermenten 35
4. Präparate, Chemikalien 37

D : ERGEBNISSE 39

I: Isolierung und Identifizierung von Stoffwechselprodukten des 3-Acetylpyridin 39

II: Quantitative Auswertung 50

III: Einfluss der 3-Acetylpyridin-Konzentration und Inkubationszeit auf die Pyridin-3-methylcarbinol-Entstehung 56

IV: Versuche mit einzelnen Zellfraktionen und verschiedenen Geweben 59

1. Zellfraktionen 59
2. Hirngewebe 60
3. Nierengewebe 60

V: Versuche mit Dehydrogenasen 61

E : DISKUSSION 65

F : ZUSAMMENFASSUNG 72

G : ABKÜRZUNGEN 74

H : LITERATURVERZEICHNIS 76

A : E I N L E I T U N G

3-Acetylpyridin (3-AP) ist ein Antimetabolit des Nicotinsäureamids (NA) und unterscheidet sich von diesem nur dadurch, dass die Aminogruppe ($-NH_3$) durch eine Methylgruppe ($-CH_3$) ersetzt ist. - Seit einiger Zeit werden die Eigenschaften dieser Substanz lebhaft diskutiert, da sie bei Ratten merkwürdige zentralnervöse Störungen hervorruft und lokalisierte Läsionen im Gehirn setzt. Eine Aufklärung dieser Wirkung könnte Rückschlüsse auf den besonderen Stoffwechsel der betroffenen Hirngebiete erlauben. 3-Acetylpyridin unterliegt in der Zelle mehreren gleichzeitig ablaufenden Stoffwechselprozessen: Einerseits konnte sein Einbau in die beiden wasserstoffübertragenden Pyridin-Cofermente anstelle des Nicotinsäureamids nachgewiesen werden. Andrerseits wurden aus dem Urin vergifteter Tiere Metaboliten isoliert, die den Stoffwechselweg von 3-AP zu Nicotinsäure wahrscheinlich machen.
Nicht im Urin ausgeschieden wird Pyridin-3-methylcarbinol (P-3-Mc). Es wurde als Hauptmetabolit des 3-AP im Gehirn vergifteter Ratten gefunden. Es entsteht aus dem 3-AP durch Reduktion der Ketogruppe in der Seitenkette zu einem sekundären Alkohol (vgl.Abb. 2). Dieses P-3-Mc hat besondere Bedeutung, weil es erstaunlicherweise bei Ratten ähnliche Symptome hervorruft wie 3-AP. - Inzwischen wurde nachgewiesen, dass P-3-Mc in vitro ebenfalls in die Pyridin-Cofermente eingebaut werden kann. In vivo wird dieser Reaktion jedoch nur dann Bedeutung zukommen, wenn im Gewebe genügend 3-AP zu P-3-Mc hydriert wird, und wenn P-3-Mc nicht weiter verstoffwechselt wird, bevor es in Cofermente eingebaut werden kann. - Ein Abbau des P-3-Mc zu Nicotinsäure wird bereits diskutiert (vgl.Abb.10). Über die Vorgänge bei der fermentativen Hydrierung des 3-AP ist jedoch noch wenig bekannt. Aus diesem Grunde schien es uns angebracht, zunächst einmal die Hydrierung zu studieren. Erst eine Klärung dieser Reaktion

lässt die Frage zu, ob P-3-Mc in grösserem Ausmass in Cofermente eingebaut werden kann oder ob es vielmehr Zwischenglied eines anderen Stoffwechselweges ist. Gegenstand dieser Arbeit war es daher zu untersuchen, unter welchen Bedingungen, mit welcher Geschwindigkeit und in welchem Ausmass P-3-Mc aus 3-AP im Gewebe entsteht. Zur Klärung dieser Probleme beschränkten wir uns auf in-vitro-Versuche. - Frühere Untersucher hatten in vitro lediglich das verschieden rasche Verschwinden von 3-AP unter dem Einfluss fermenthemmender Substanzen geprüft. Unser Anliegen musste sein, Stoffwechselprodukte selbst zu fassen, sie zu identifizieren und quantitativ zu bestimmen.

B : ÜBERBLICK ÜBER DEN GEGENWÄRTIGEN STAND DER 3-ACETYLPYRIDINFORSCHUNG

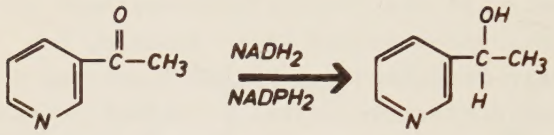
I : 3-Acetylpyridin und Pyridin-3-methylcarbinol als Antivitamine.

Die von uns erzielten Ergebnisse treten mit einer Reihe von Problemen der 3-Acetylpyridinforschung in Beziehung. Deshalb scheint es uns angebracht, einen kurzen Überblick über ihren jetzigen Stand zu geben.

Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid (NAD, früher DPN) und Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotidphosphat (NADP, früher TPN) wurden 1931 von WARBURG und CHRISTIAN (72-75) als Cofermente der wasserstoffübertragenden Enzyme entdeckt. Als solche sind sie für den gesamten Zellstoffwechsel von überragender Bedeutung.
Der für die Wasserstoffübertragung verantwortliche Bestandteil beider Cofermente ist das Nicotinsäureamid, eine Pyridinbase. Diese ist mit der Adenosin-5'-diphosphatribose (APPR) N-glycosidisch zu NAD verbunden; NADP unterscheidet sich von NAD nur durch eine Phosphatmonoestergruppe in Stellung 2' der Adenosinribose (vgl.Abb.1).

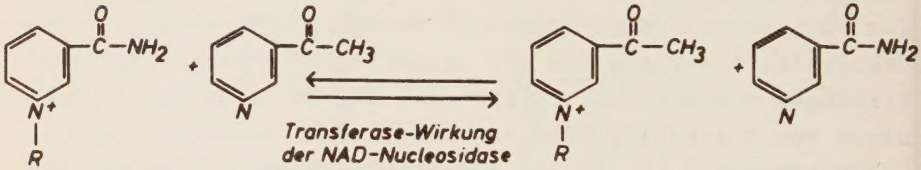
Von grossem pharmakologischen Interesse ist nun die Entdeckung von KAPLAN und Mitarbeitern (40, 43, 46), dass in vitro bestimmte Verbindungen anstelle des Nicotinsäureamids auf die APPR übertragen werden können. COPER und HERKEN (18, 20) haben diesen Vorgang auch in vivo und zwar im Gehirn nachgewiesen. Es handelt sich bei jenen Verbindungen um Substanzen, die dem Nicotinsäureamid strukturanalog sind; man nennt sie nach der von WOODS (79) am Beispiel der p-Aminobenzoesäure ausgearbeiteten Antivitamintheorie "Antimetaboliten" oder besser nach COPER

Hydrierung des 3-Acetylpyridin



3-Acetylpyridin *Pyridin-3-methylcarbinol*

Abb. 2



NAD + 3-Acetylpyridin ⟶ 3-APAD + Nicotinsäureamid

Abb. 3 Umwandlung von NAD in 3-APAD R = Adenosindiphosphatribose

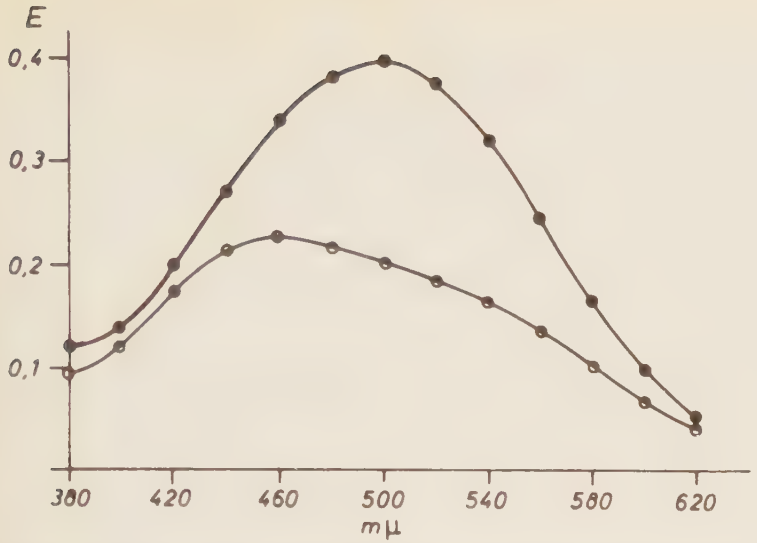


Abb.4. Spektrum des Dinitrophenylhydrazons von 3-APAD ●—●—● und 3-AP ○—○—○ (nach N.O.KAPLAN)

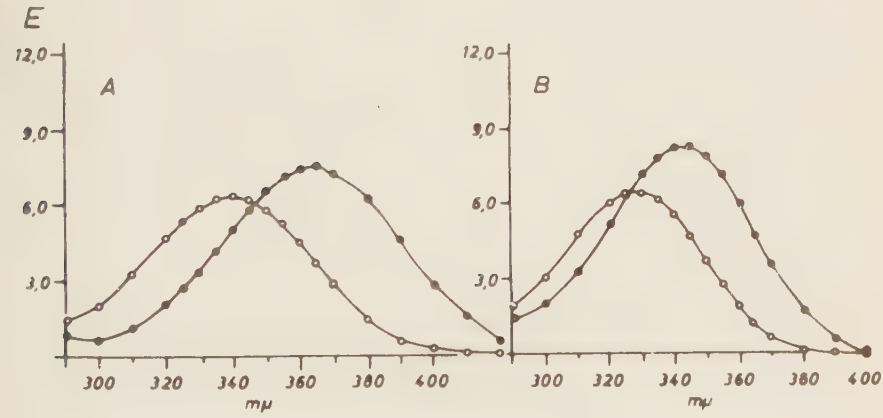


Abb 5: A) Spektrum von $NADH_2$ ○—○—○ und 3-$APADH_2$ ●—●—●

B) Spektrum von NAD ○—○—○ und 3-APAD ●—●—●

in 1n KCN (nach N.O.KAPLAN)

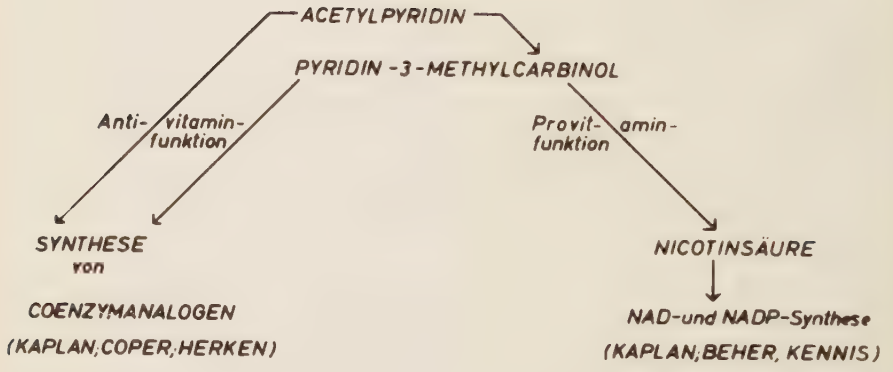
und Abb.5) und seine Eigenschaften als Cofaktor einiger Dehydrogenasen, so der Alkoholdehydrogenase (ADH) und Lactatdehydrogenase (LDH). Sie fanden sowohl quantitative wie qualitative Unterschiede gegenüber dem NAD: quantitative, weil je nach der Art des Enzyms entweder Aktivitätsverminderung oder- steigerung auftrat; qualitative, da z.B. pH-Unterschiede das Analoge auf andere Weise beeinflussten als NAD.
3-APAD konnte zunächst nicht direkt aus dem Gehirn vergifteter Tiere isoliert werden, doch gelang es nachzuweisen (40), dass eine NAD-Nucleosidase aus Taubengehirn in vitro den Einbau von 3-AP in NAD bewirkt. Weitere Forschungsarbeit (46) erstreckte sich auf die NAD-Nucleosidase des Gehirns und ihre verschieden grosse Aktivität in den einzelnen Gehirnregionen. Im Hypothalamus fand man die höchsten Werte in eben den Gebieten, in denen HICKS (31) anatomische Schäden bei 3-AP-vergifteten Tieren feststellte. HICKS (31) erkannte ausserdem, dass 3-AP bei neugeborenen Ratten nicht zu Läsionen führt. BURTON (12) fand ergänzend dazu nur eine sehr niedrige NAD-Nucleosidaseaktivität im Gehirn neugeborener Ratten. COPER, HERKEN und HELGE (17) sowie COPER (19, 22) untersuchten ebenfalls die NAD-Nucleosidase und konnten sie in der Mikrosomenzellfraktion lokalisieren und feststellen, dass Aktivitätsunterschiede in verschiedenen Gebieten des Gehirns vorliegen. Es gelang ihnen auch (9, 29), 3-APAD direkt aus dem Gehirn vergifteter Ratten nachzuweisen. Bis zu ,7% des NAD waren in 3-APAD umgewandelt. Es handelte sich dabei jedoch um eine Mittelwertbestimmung aus dem gesamten Gehirn. Es ist also durchaus denkbar, dass in einzelnen Regionen des Gehirns entsprechend der grösseren Nucleosidaseaktivität eine höhere 3-APAD-Konzentration zu finden ist. Dies bestätigen Untersuchungen von NEUHOFF (58), der eine mikroanalytische Methode entwickelte, mit deren Hilfe sich kleinste Mengen von 3-APAD aus den einzelnen Gehirnregionen bestimmen lassen. Er fand im Hippocampus relativ höhere Werte.

Diese spektrofluorometrische Analyse verschiedener Hirnabschnitte von Ratten, die 100 mg/kg 3-AP intraperitoneal erhalten hatten, ergab auch, dass die Bildung des 3-AP-enthaltenden Nucleotids nach ungefähr einer Stunde beginnt und den maximalen Wert nach sechs bis acht Stunden erreicht (10).

Ein weiterer wichtiger Befund von BRUNNEMANN, COPER und HERKEN (10) war die Feststellung, dass Mikrosomenenzyme des Gehirns nach gleicher Inkubationszeit aus NADP viermal mehr 3-APADP (3-Acetylpyridin-Adenin-Dinucleotidphosphat) synthetisieren als bei analogen Versuchen mit NAD. Dies ist besonders deswegen von Bedeutung, weil im Gehirn die Konzentration des NADP 15 bis 20mal geringer ist als die des NAD.

COPER und NEUBERT (21) untersuchten die Aktivitätsänderung der Glucose-6-phosphatdehydrogenase, der 6-Phosphogluconatdehydrogenase, der Glutathionreduktase, der Isocitricodehydrogenase und der Glutamatdehydrogenase aus dem Gehirn von Ratten mit 3-APADP als Cofaktor an Stelle des NADP. Die Umsatzgeschwindigkeit aller angegebenen Fermente war mit Ausnahme der Glucose-6-Phosphatdehydrogenase erheblich verringert. Die genannten Autoren diskutieren die Möglichkeit, dass 3-APADP, als schlechterer Wasserstoffcarrier, ein echter Hemmstoff der Reaktion sein könnte, wenn es nähere Affinität zum Rezeptor besitzt als das NADP. Diese Wirkung könnte auch anderen NADP-Analogen, wie z.B. dem Pyridin-3-methylcarbinolanalogen zukommen, das gar nicht mehr als Wasserstoffüberträger wirken kann. P-3-Mc, der Hauptmetabolit des 3-AP, wird nach in vitro-Versuchen von BRUNNEMANN und COPER (11) ebenfalls in NAD und NADP eingebaut. In vivo wurde dieser Einbau bislang noch nicht nachgewiesen.

Die Diskussion darüber, ob die zentralnervösen Störungen des 3-AP und P-3-Mc auf deren hier beschriebenen Antivitamineffekt zurückzuführen sind, ist noch nicht abgeschlossen.



Antivitamin- und Provitaminfunktion des 3-Acetylpyridin und des Pyridin-3-methylcarbinol

Tafel 1

II : 3-Acetylpyridin und Pyridin-3-methylcarbinol als PROVITAMINE.

KAPLAN und Mitarbeiter (45) wiesen als erste darauf hin, dass 3-AP ebenso wie P-3-Mc auch als Provitamin wirken können (siehe Tafel 1). Sie fanden bei deren Applikation fast den gleichen Anstieg der NAD-Bildung in der Leber wie nach Gabe von Nicotinsäureamid. Nicotinsäure selbst war weit weniger wirksam.

Tafel 2 :

i.p. Injektion von 250 mg/kg	NAD-Konzentration in γ pro gr. Leber
Leerversuch	520
Nicotinamid	2830
Nicotinsäure	760
3-Acetylpyridin	2500
Pyridin-3-methylcarbinol	1870

Versuche von BEHER und Mitarbeitern (2, 3) führten nach Anwendung von 3-AP und P-3-Mc bei Hunden zu verstärkter Ausscheidung von N-methyl-nicotinamid.
Sie diskutierten als Möglichkeit für dessen Entstehung:

1. Verdrängung von Nicotinamid vom NAD und NADP.
2. Blockierung des Anbaus von Nicotinamid an APPR.
3. Entstehung von Nicotinamid durch Oxydation und Decarboxylierung des 3-AP.

Die letztgenannte Möglichkeit rückte dadurch in den Vordergrund (4), dass man nach Anwendung von ^{13}C-markiertem 3-AP einen grossen Teil der Aktivität im N-methyl-nicotinamid des

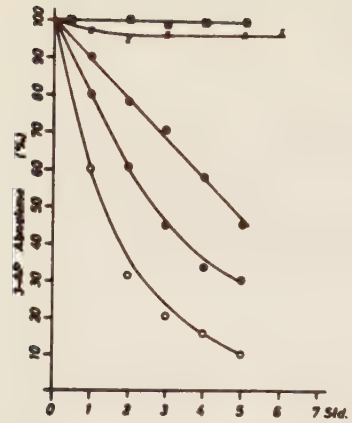


Abb. 6 : Das Verschwinden von 3-AP (%) beim Inkubieren mit verschiedenen Geweben:
(○) Leberscheiben, (●) Nierenscheiben
(◑) Gesamtblut, (x) Blutplasma
(■) Muskelscheiben

(nach W.T. BEHER)

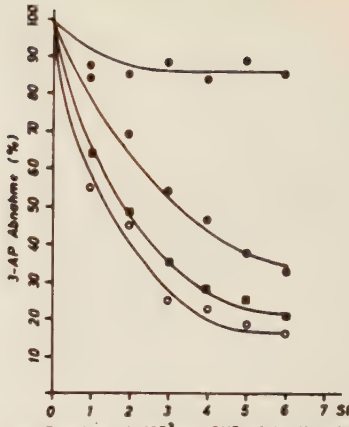


Abb. 7 : Der Effekt von 2×10^{-3} mol CN^- auf das Verschwinden von 3-AP beim Inkubieren mit verschiedenen Geweben:
(○) Leberscheiben, (■) Leberscheiben mit 2×10^{-3} mol CN^-
(●) Nierenscheiben, (◐) Nierenscheiben mit 2×10^{-3} mol CN^-

(nach W.T. BEHER)

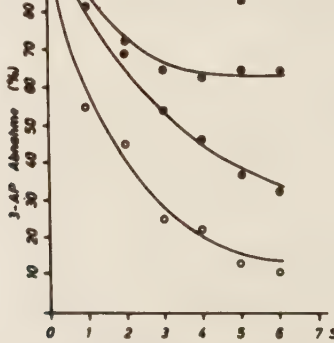


Abb. 8 : Der Effekt von 2×10^{-3} mol JCH_2COO^- auf das Verschwinden von 3-AP beim Inkubieren mit verschiedenen Geweben:
(○) Leberscheiben, (◐) Leberscheiben mit 2×10^{-3} mol JCH_2COO^-
(●) Nierenscheiben, (■) Nierenscheiben mit 2×10^{-3} mol $JCH\ 600^-$

(nach W.T BEHER)

Urins wiederfand. Zwei weitere isotopenhaltige Substanzen im Urin der Versuchstiere konnten nicht identifiziert werden. Es handelte sich nicht um 3-AP oder P-3-Mc.

Bei seinen in-vitro-Experimenten (5) inkubierte BEHER Gewebescheiben verschiedener Organe mit 3-AP und bestimmte nach unterschiedlichen Zeitintervallen dessen Schwund, indem er den Ansatz mit Aether bei pH 10 extrahierte und die Extinktion bei 227 mμ bestimmte.

Er fand, dass nach zwei Stunden 50% des inkubierten 3-AP verschwunden waren. Jodessigsäure hemmte den Lebermetabolismus, während das Cyanid nur das Nierengewebe hemmend beeinflusste. Metaboliten des 3-AP fand BEHER bei diesen Versuchen nicht, auch konnte er in Ansätzen mit Zellhomogenat kein Verschwinden von 3-AP feststellen (vgl.Abb.6,7,8). Um die Decarboxylierung des 3-AP nachzuweisen, führte BEHER (6) mit Ratten folgende Versuche durch: Er spritzte ^{14}C -markiertes 3-AP und fand in den ersten 24 Stunden 30% der applizierten Aktivität im CO_2 der Atemluft wieder. Auch im Urin fand er ^{14}C-Aktivität, jedoch nicht in Form von Bicarbonat, Formiat, Acetaldehyd oder unverändertem 3-AP. In seiner Diskussion über den Abbau des 3-AP zur Nicotinsäure zieht er Parallelen zu der von THIERFELDER und DAIBER (71) beschriebenen Umwandlung von Acetophenon zu Benzoesäure und fordert hypothetisch die Entstehung von Nicotinsäure, Nicotinsäureamid, N-Methylnicotinsäureamid, 3-Acetyl-6-pyridon und Pyridin-3-methylcarbinol.

Ein Teil dieser Metaboliten wurde inzwischen aufgefunden: KANIG (33) fand bei der Untersuchung der freien Nucleotide des Gehirns mit der Ionenaustausch-Chromatographie (34,49, 50) nach Anwendung von 3-AP und Tötung der Ratten auf dem Höhepunkt der Vergiftung in der Fraktion 1 drei neue Unterfraktionen $1a_2$, $1b_2$ und 1c (vgl.Abb. 9). Diese Unterfraktionen waren bei Tötung der Tiere 16 Stunden nach der 3-AP-injektion nicht mehr aufzufinden. Bei Versuchen mit Tritiummarkiertem 3-AP fanden sich nach fünf Stunden 6 - 7% der injizierten Aktivität im Gehirn. Die drei neuaufgefundenen Fraktionen enthielten radioaktives Material, mehr als die Hälfte in Fraktion $1a_2$, sehr wenig in Fraktion 1c.

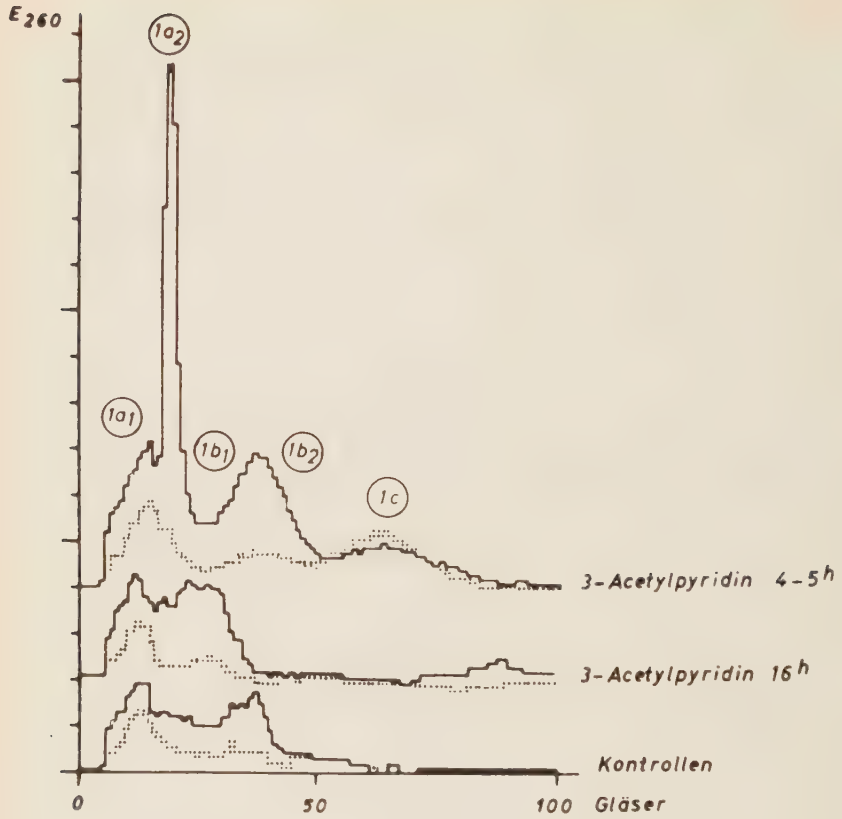


Abb.9: Vergleich der Fraktion 1 von Chromatogrammen aus Versuchen mit 3-Acetylpyridin nach verschiedener Einwirkungsdauer.

——— E_{260} ..... E_{280}

(nach K.KANIG)

Die Fraktion $1a_2$ konnten KÄNIG und KORANSKY (36) als Pyridin-3-methylcarbinol identifizieren. Es scheint das Hauptstoffwechselprodukt des 3-AP im Gehirn zu sein. Fraktion $1b_2$ enthielt unverändertes 3-AP, während die Fraktion 1c zunächst nicht eingeordnet werden konnte. Sein UV-Absorptionsspektrum ähnelt dem später von NEUHOFF (59) identifizierten 3-Acetyl-6-pyridon (vgl.Abb.24). P-3-Mc erwies sich in biologischen Versuchen (33,37) als ebenso toxisch wie 3-AP und hatte die gleiche LD_{50}. Nahezu identische zentralnervöse Vergiftungserscheinungen traten auf und Nicotinsäureamid schützte ebenfalls. Dies zeigt, dass ein Stoffwechselprodukt dieselben Symptome auslösen kann wie sein Ausgangsprodukt.

Zwei weitere Metaboliten des 3-AP wurden von NEUHOFF und HARRIS (59) im Urin vergifteter Ratten gefunden und identifiziert. Es handelte sich um 3-Acetyl-6-pyridon und N-Methyl-3-acetyl-6-pyridon; auf ersteres entfielen 25%, auf letzteres 0,3% der im Urin aufgefundenen Radioaktivität.

McKENNIS und Mitarbeiter (47) stellten in einer kürzlich veröffentlichten Arbeit ein Schema für die Umwandlung von 3-AP zu Nicotinsäure auf (vgl.Abb.10). Ausgangspunkt für dieses Schema waren die von ihnen aufgefundenen zwei weiteren Metaboliten N-Methyl-3-methylcarbinol und (3-Pyridyl)-1,2-äthandiol im Urin 3-AP behandelter Hunde.

III : <u>3-Acetylpyridin als Hemmer der Nicotinamidase</u>.

YOSHI und HANDLER (32) berichteten von einer weiteren pharmakologischen Wirkung des 3-AP.
Es hemmte kompetitiv mit einem K_i von $3{,}05 \times 10^{-4}$m eine spezifische Nicotinamidase, die rein aus Torula cremoris

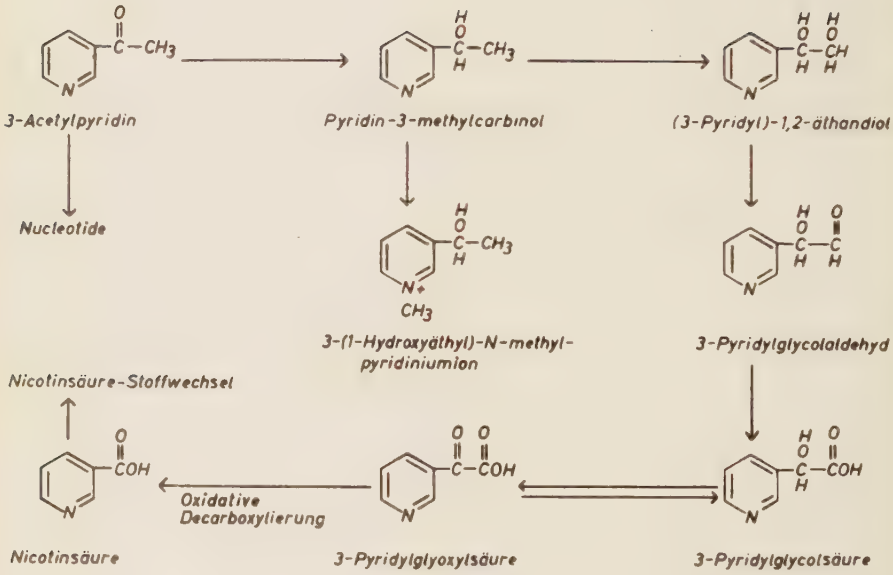


Abb. 10: „Hypothetischer Weg des 3-A-P zur Nicotinsäure (nach Mc KENNIS)".

dargestellt wurde. Wenn man das 3-AP durch Dialyse gegen einen Puffer entfernte, so wurde das Enzym wieder reaktiviert.
Die Autoren untersuchten noch eine Anzahl weiterer Nicotinamid-ähnlicher Substanzen (P-3-Mc war nicht dabei), die alle keine Hemmung der Nicotinamidase verursachten.

C : METHODIK

I : Bestimmungsmethode

1. Anforderungen an das Trennverfahren

Wir benötigten für unsere Versuche ein Trennverfahren, das folgende Forderungen erfüllen musste :

A : Kleine Volum- und Substanzmengen mussten für die Trennung ausreichen, da unsere Ansätze ein Volumen von durchschnittlich 1 - 2 ml nicht überschritten. Infolgedessen konnten wir nicht, wie KANIG und KORANSKY (34,49) die bewährte Ionenaustausch-Chromatographie verwenden.

B : Das Verfahren sollte rascher und unkomplizierter arbeiten als die Ionenaustausch-Chromatographie, um eine genügende Anzahl von in-vitro-Versuchen unter jeweils verschiedenen Bedingungen zu gestatten.

C : Störende Begleitstoffe, wie Salze, Fette oder Blutfarbstoffe, können aus den kleinen Proben unserer Ansätze nur schwer und nicht ohne erhebliche Substanzverluste entfernt werden. Unser Trennverfahren sollte daher möglichst unempfindlich gegen diese Stoffe sein.

D : $NADH_2$ und $NADPH_2$ waren Cofermente der Hydrierung von 3-AP zu P-3-Mc.

Fügten wir unseren Ansätzen diese Cofermente bei, so hatten wir mit der Entstehung von Spaltprodukten, etwa Nicotinsäureamid (NA) oder Adenosindiphosphatribose (APPR) zu rechnen. Ausserdem war daran zu denken, dass im Ansatz Cofermentanaloge mit 3-AP oder P-3-Mc entstehen können. So war es unser Anliegen, mit einem einfachen Routineverfahren diese Vielzahl von Substanzen,

yridinbasen und Nucleotide, zugleich aufzutrennen.

. Papier-Chromatographie (PC)

ir benutzten folgende 3 Fliessmittel :

m.A: Isobutanol - Aceton - Eisessig - 5%iger Ammoniak
21 : 15 : 15 : 16 (im Volumenverhältnis)

m.B: Isopropanol - Salzsäure - H_2O
170 : 41 : 39

m.C: Isobuttersäure - Ammoniak (25%ig) - H_2O
66 : 1 : 33

ie für uns wesentlichen Rf-Werte sind in Tafel 3 angegeben.
ir chromatographierten aufsteigend in geschlossenen Trögen
uf Whatman Nr. 1 - Papier.
ei den ersten Versuchen, bei denen wir Proben der enteiweissten in-vitro-Ansätze auftrugen und sie mit Fm.A entwickelten, erhielten wir folgende Auftrennung:
eim Leerversuch, bei dem wir dem Ansatz 3-AP ohne reduziertes Coferment zufügten, erhielten wir nur einen starken leck mit einem Rf von 0,95. Das UV-Spektrum der im Fleck nthaltenen Substanz glich dem des 3-AP.
ei Versuchen mit $NADH_2$ oder $NADPH_2$ als Coferment liefen ie säurelöslichen Nucleotide bei niedrigen Rf-Werten (siehe Tafel 3), während sich die Pyridinbasen von diesen gut btrennten und sich in 2 Flecke aufteilten. Das UV-Spektrum es ersten Flecks bei einem Rf von 0,95 war wieder ein -AP-Spektrum, während der zweite Fleck kein eindeutiges pektrum ergab. - Da Pyridin-3-methylcarbinol und Nicotinäureamid bei diesem Fliessmittel denselben Rf-Wert haben, chien es uns durchaus möglich, dass zumindest diese beiden ubstanzen in Fleck 2 enthalten waren.

Substanzen	Fm: A	Fm: B	Fm: C
3-AP	0,95	0,70	0,95
P-3-Mc	0,85	0,80	0,95
NS	0,83	0,60	0,90
NA	0,83	0,55	0,95
NAD	0,25	0,50	0,25
NADP	0,15	0,30	0,30
3-APAD	0,45	0,30	0,60

Tafel 3: Rf-Werte für Fm. A, B und C auf Whatman Nr. 1 Papier bei einer Laufstrecke von 18 cm

Versuch	[Fleck 1]:[Fleck 2] bei UV-Absorption = Q_1	[Fleck 1]:[Fleck 2] bei c.p.m. = Q_2	$Q_1 : Q_2$
mit $NADH_2$	1 : 0,45	1 : 0,2	$Q_1 > Q_2$
mit $NADPH_2$	1 : 0,4	1 : 0,3	$Q_1 > Q_2$

Tafel 4: Das Verhältnis von Fleck 1 zu Fleck 2 bei Versuchen mit $NADH_2$ und $NADPH_2$: Q_1 ist das Verhältnis der UV-Absorption, Q_2 das der Radioaktivitäten. Die Messwerte von Fleck 1 wurden als 1 angegeben.

Wir arbeiteten mit Tritium-markiertem 3-AP ++ und fanden, dass sowohl Fleck 1 wie auch Fleck 2 Radioaktivität enthielten (vgl.Abb.11).
Wir verglichen nun das Verhältnis der UV-Absorption (Q_1) beider Flecke mit dem Verhältnis ihrer Radioaktivität (Q_2) und fanden für Q_2 einen viel kleineren Wert (siehe Tafel 4). Dadurch wurde unsere Vermutung bestätigt, dass Fleck 2 noch unmarkierte Pyridinbasen enthielt.
Deshalb suchten wir nun ein Trennverfahren, das eine bessere Auftrennung der Pyridinbasen ermöglichte. Die PC erfüllte unsere Erwartungen in dieser Hinsicht nicht. Ausserdem war auch die lange Trennzeit der PC nachteilig. Aus diesen Gründen erprobten wir die Dünnschicht-Chromatographie.

3. Dünnschicht-Chromatographie (DC)

Die DC hatte folgende Vorteile :

- Niedrige Nachweisgrenze
- Erheblicher Zeitgewinn
- Unempfindlichkeit gegen Begleitstoffe
- Hohes Auflösungsvermögen, besonders für Pyridinbasen.

Wir entwickelten die DC zu einem für unsere Zwecke geeigneten Routineverfahren.

++ Versuche mit Isotopen wurden in der Isotopenabteilung des Pharmakologischen Instituts (Direktor: Prof.Dr.med. H. Herken) der Freien Universität Berlin unter Anleitung von Herrn Prof.Dr.med.W.Koransky durchgeführt. Tritium-markiertes 3-Acetylpyridin war dankenswerterweise von Schulze, Münch und Koransky zum Teil unter Verwendung der Anlagen der Firma Schering hergestellt worden.

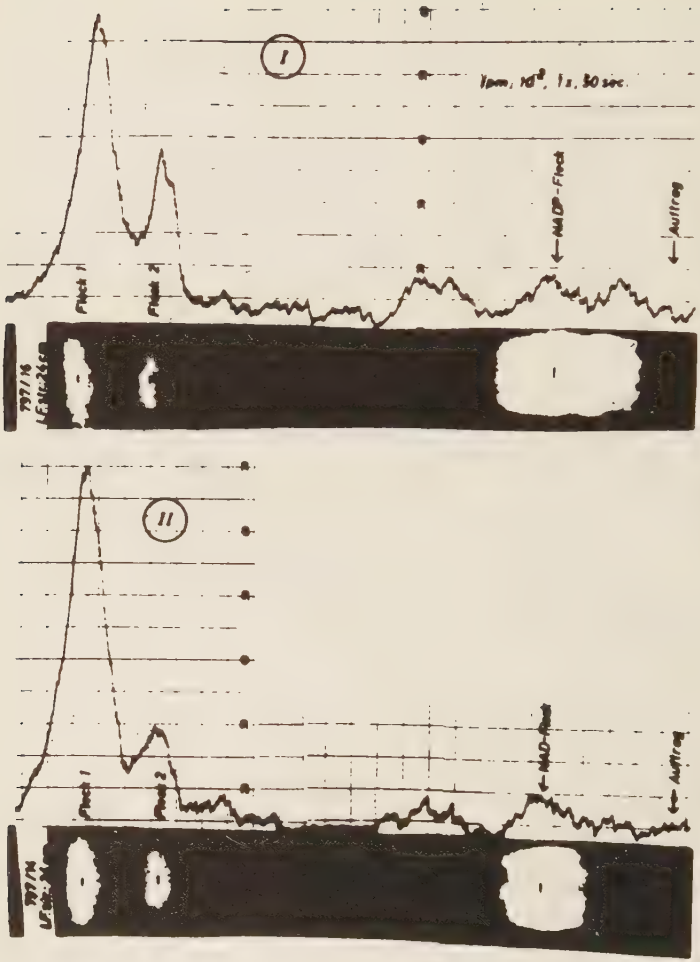


Abb 11

(I) Papierchromatogramm eines mit NADP als Coferment durchgefuhrten In-vitro-Ansatzes
Daruber die dazugehorige Zählkurve des Methandurchfluss-zählrohrs

(II) Papierchromatogramm eines mit NAD als Coferment durchgefuhrten In-vitro-Ansatzes.
Daruber die dazugehorige Zählkurve des Methandurchfluss-zählrohrs

a) Arbeitstechnik

Wir stellten die Platten nach dem von E. STAHL (70) angegebenen Verfahren mit der Desaga-Grundausrüstung Nr. 600 her und wählten eine Schichtdicke von 250 µ. Als Sorptionsmittel verwandten wir zunächst Kieselgel G der Firma Merck. Der Calziumsulfatgehalt dieses Sorptionsmittels hat den Nachteil, dass freie Phosphorsäurereste an der Startlinie festgehalten werden und ausserdem beim Eluieren der Flecke in n/10 HCl ein Teil des Calziumsulfats (7,0) in Lösung geht, was die Reinheit der UV-Spektren beeinträchtigt. Deshalb verwandten wir mit gutem Erfolg gipsfreies Kieselgel H, ebenfalls von der Firma Merck. Für die Dünnschicht-Hochspannungs-Elektrophorese benutzten wir MN-Cellulosepulver 300 von der Firma Macherey, Nagel & Co., Düren. Von derselben Firma bezogen wir MN-Zellulosepulver 300 DEAE (Diäthylaminoäthylcellulose) und den Anionen-Austauscher MN-300 ECTEOLA zur Trennung von Nucleotiden. Normalerweise aktivierten wir die DC-Platten nicht bei höheren Temperaturen, sondern liessen sie über Nacht an der Luft trocknen. Auf diese Weise erzielten wir besser reproduzierbare Rf-Werte.
Unsere Chromatogramme entwickelten wir aufsteigend in verschlossenen Glaströgen. Um diese gleichmässig mit Fliessmitteldämpfen zu sättigen, wurden sie mit Filtrierpapier ausgelegt, das in Fliessmittel getränkt war (KS-System). Dadurch wurde der Abdampfeffekt verringert, der zu einer Verzerrung der Rf-Werte, meist einem Zusammenschieben der Banden an der Fliessmittelfront, führt. In noch viel stärkerem Masse wurde dieser Effekt mit der Sandwich-Methode (S-System) ausgeschaltet. Auf dieses Verfahren gingen wir mehr und mehr über, da es neben der besseren Trennung auch eine beträchtliche Einsparung von Fliessmittel ermöglicht.

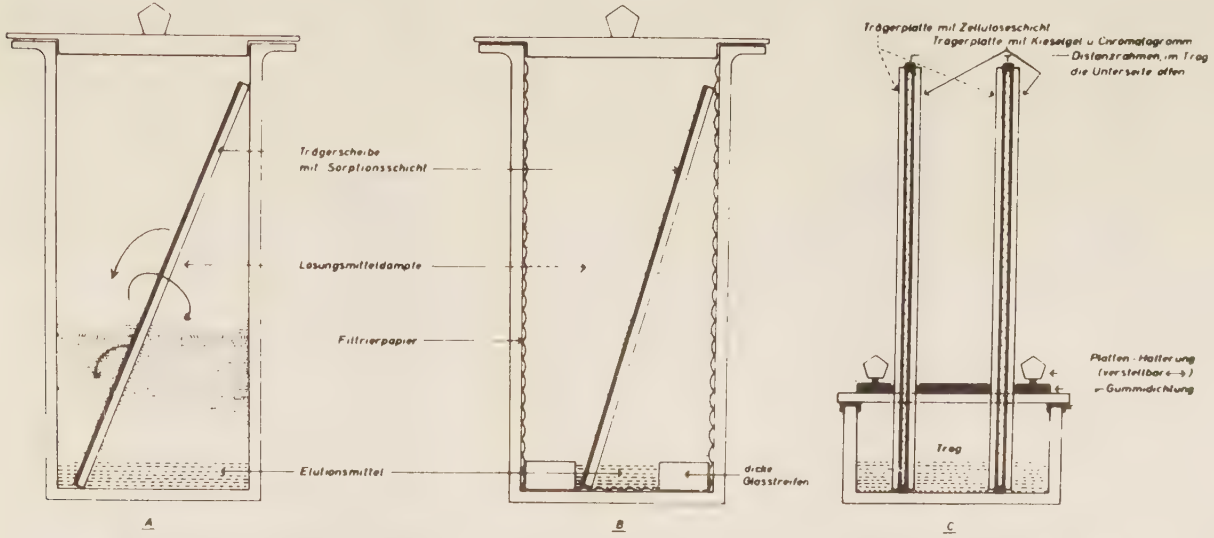


Abb. 12 Trennkammern und Sättigung. A Trogkammer mit normaler Sättigung (=NS). Die von der Sorptionsschicht abgehenden Pfeile sollen das Abdampfen des Fließmittels und die Punktierung die Dampfdichte symbolisieren. B Trogkammer durch Filtrierpapierauskleidung mit dem Fließmittel gesättigt (=KS). C Verringerung des Kammervolumens durch das S-Kammersystem (modifiziert nach E. STAHL)

Fließmittel: 1

Trennsystem	KS	S
3-AP	88	87
P-3-Mc	79	65
NS	8	10
NA	59	47
Höhe in cm	10	10
Zeit	40'-45'	45'

Fließmittel: 2

Trennsystem	KS	S
3-AP	64	65
P-3-Mc	15	10
NS	52	47
NA	40	35
Höhe in cm	12	12
Zeit	50'	60'

Fließmittel: 3

Trennsystem	KS	S
3-AP	77	77
P-3-Mc	62	64
NS	35	32
NA	50	53
Höhe in cm	10	10
Zeit	40'	30'

Fließmittel: 4

Trennsystem	KS	S
3-AP	58	59
P-3-Mc	62	66
NS	22	21
NA	47	50
Höhe in cm	10	10
Zeit	70'	98'

Tafel 5: Unterschiede der Rf-Werte (Rf x 100) und Trennungszeiten in verschiedenen Trennkammern:

KS = Trogkammer mit Filtrierpapierauskleidung
S = Sandwich-Kammer

Tafel 5 zeigt einen Vergleich von Rf-Werten, die wir mit dem KS- und S-System erzielten.
Die S-Kammer hatte eine Tiefe von 0,2 cm. Gegenseite war eine Trägerplatte mit Zelluloseschicht, die sich wegen ihrer grossen Festigkeit besonders für diesen Zweck eignete. (Einzelheiten vgl. Abb. 12).

b) Dokumentation

Um unsere Substanzen, die alle eine gute Lichtabsorption im UV-Bereich bei 260 mμ besitzen, besser sichtbar machen zu können, mischten wir dem Kieselgel den Fluoreszensindikator ZS-Super der Firma Riedel de Haen AG. bei. Über einer UV-Quarzlampe waren dann die einzelnen Banden gut sichtbar. Wir dokumentierten unsere Chromatogramme meist so, dass wir sie auf Transparentpapier durchzeichneten.
Das Photographieren der DC-Platten mit dem Photokontaktverfahren machte Schwierigkeiten, weil durch die Dicke der Glasplatte die Schärfe der Banden verzerrt und ausserdem die Lichtemission des Leuchtpigments abgeschwächt wurde. Wir benötigten deshalb eine Belichtungszeit von 10 Minuten. Abb. 13 gibt die Kontaktphotographie eines mit Fliessmittel chromatographierten Ansatzes wieder. Abb.14 zeigt unsere Photographiervorrichtung im Schnitt.
Direktphotos waren zu erzielen, wenn man die Chromatogramme dem König-Farbtest auf Pyridinbasen unterzog. Dadurch gingen aber die Substanzen für die weitere Verwendung verloren. [1.
Gefärbte Chromatogramme besprühten wir mit "Neatan-neu" der Merck AG. und konnten sie dann als Folie von der Trägerplatt ablösen und für längere Zeit aufbewahren.

Leitchromatogramm

Abb. 13: Photographie der UV-absorbierenden Banden auf einer DC – Platte nach dem im Text angegebenen Verfahren.

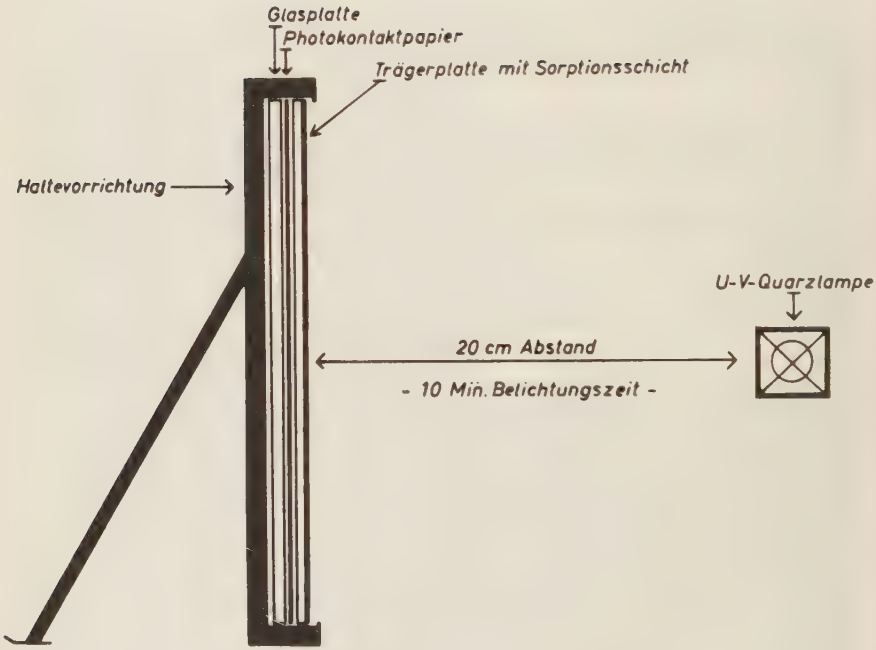


Abb. 14. Schematische Darstellung der Photographiervorrichtung

C : Qualitative Auswertung

Qualitativ werteten wir unsere Chromatogramme wie folgt aus :

1. Vergleich der Rf-Werte.
Mit dem von uns benützten KS- und S-Kammersystem erzielten wir ziemlich verlässliche Rf-Werte; dennoch spielten diese für uns nur die Rolle von Richtwerten. Wir chromatographierten daher

2. die fragliche Substanz in unseren fünf verschiedenen Fliessmitteln zusammen mit den entsprechenden Testsubstanzen. Eine Substanz, die in allen Fliessmitteln dem jeweiligen Leitchromatogramm entsprach, war mit einiger Sicherheit als mit diesem identisch anzusehen.

3. Obwohl sich die UV-Spektren der Pyridinbasen sehr ähneln, sind die Unterschiede gross genug, um das UV-Spektrum zu einem wertvollen Hilfsmittel der Identifizierung zu machen. Wir schrieben das Spektrum in n/10 NaOH und n/10 HCl (siehe Abb.27).

4. Der König-Farbtest ist eine spezifische Farbreaktion auf Pyridinbasen und Alkaloide mit Pyridinring.
Die DC-Platte wurde eine Stunde lang Bromcyanid-Dämpfen ausgesetzt und dann mit einem Reagens besprüht (2 g p-Aminobenzoesäure, in 75 ml 0,75 n-HCl gelöst, werden mit 96 vol%igem Alkohol auf 100 ml aufgefüllt). Bromcyan öffnet den Ring der Pyridinverbindungen, und es entstehen Derivate des Glutaconaldehyds. Diese geben mit aromatischen Aminen intensiv gefärbte Kondensationsprodukte.
Schreibt man das Spektrum dieser aufgetretenen Farben im Beckman-Spektralphotometer DK2 von 590-350 mμ , so

ergeben sich bei den verschiedenen Pyridinbasen verschiedene Spektren. 3-AP und Nicotinsäureamid färbten sich orange, Nicotinsäure rot, P-3-Mc nach längerer Einwirkungszeit des Sprühreagens rosa und NAD gelb.

5. In einigen Fällen verwandten wir zur Identifizierung das Verfahren der Isotopenverdünnung.

d) Quantitative Auswertung

Sämtliche von uns durchgeführten Versuche wurden auch quantitativ ausgewertet. Wir kratzten die UV-absorbierenden Flecke aus und eluierten das Kieselgel mehrmals mit n/10 HCl oder Methanol. In diesem Eluat bestimmten wir sowohl die UV-Absorption bei 260 mμ wie auch die Radioaktivität im Packard-Liquid-Scintillationszähler. Eine graphische Darstellung der Radioaktivität war möglich, wenn wir die DC-Platte unter einem Methan-Durchflusszählrohr durchzogen. Für den kontinuierlichen Transport sorgte ein Dünnschichttransportgerät (Scanner)++. Als Durchschnittswert aus 50 quantitativ ausgewerteten Chromatogrammen erhielten wir für die Pyridinbasen beim Messen der UV-Extinktion eine Ausbeute von 85± 10%, für Nucleotide lagen die Werte etwas höher.
Bei Versuchen mit Tritium-markierten Pyridinbasen lag die Ausbeute um 5% niedriger. Wir erklärten diesen Unterschied mit zu niedrigen Leerwerten bei der UV-Absorption. Es war unmöglich, zwischen der Vielzahl der Banden unserer Chromatogramme flächengleiche Leerwerte auszukratzen. So nahmen wir unsere Leerwerte von "Blindplatten", die wir mit den entsprechenden Fliessmitteln entwickelt hatten.

++Firma: Prof. Berthold

Um exakt quantitativ und ausserdem gleichzeitig mit mehreren Proben arbeiten zu können, entwickelten wir ein genau arbeitendes Auftragegerät ++ (siehe Abb. 15): Sechs 0,1 ml-Pipetten wurden mit einer nach unten gebogenen dünnen Kunststoffspitze versehen und so fixiert, dass ihr Winkel zur Waagrechten mit einer Schraube (S_1) verstellbar war. Ein Hebel (H) konnte gleichzeitig sämtliche Pipetten von der Platte abheben, während mit S_1 der Winkel für jede Pipette einzeln regulierbar war. So konnte die Pipettenspitze genau auf die Plattenhöhe eingestellt werden. Am hinteren Ende waren die Pipetten an einen Kunststoffschlauch angeschlossen, der mit einer Wasserstrahlpumpe in Verbindung stand.
Eine kleine zylindrische Stempelpumpe, regulierbar durch die Schraube S_2, war durch ein T-Stück dazwischengeschaltet. Die hintere Schraube (S_3) schloss den Schlauch gegen die Wasserstrahlpumpe ab, während man mit der mittleren Schraube (S_2) das Volumen der zylindrischen Kammer vergrössern und verkleinern konnte und so Flüssigkeit in die Pipette einsaugen und dann wieder in kleinsten Mengen (10^{-3}ml) auf die DC-Platte auftragen konnte. Nach dem Auftragen konnten die Pipetten dann mit Hilfe der Wasserstrahlpumpe gereinigt werden.

- -

++ Für die technische Ausführung danke ich Herrn Heilmann, dem Feinmechaniker unserer Neurochemischen Abteilung.

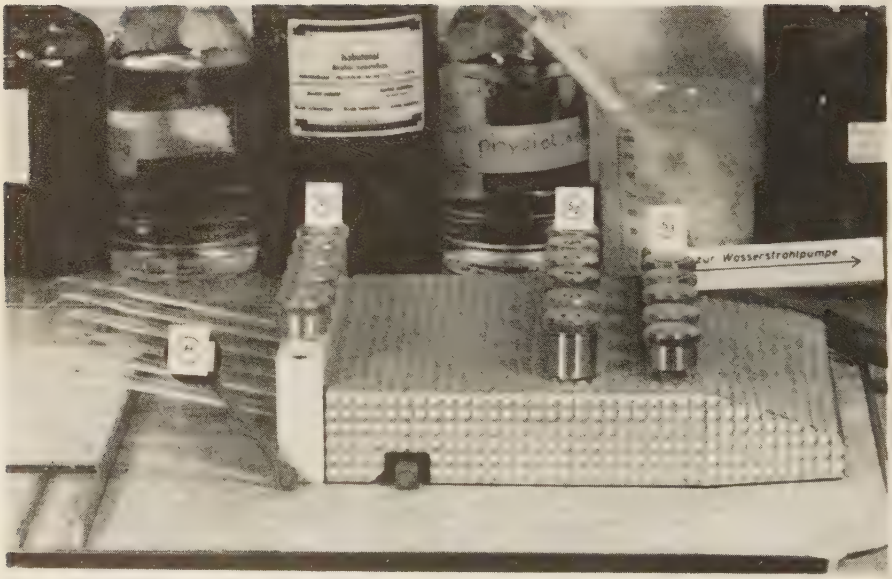


Abb.15: Auftragevorrichtung für kleine Proben auf Dünnschichtplatten.

e) Wasserdampfflüchtigkeit der Pyridinbasen

Vor eine relativ schwierige Aufgabe waren wir dadurch gestellt, dass die Pyridinbasen wasserdampfflüchtig sind. Das gilt besonders für P-3-Mc. Schon KANIG (33) machte bei seinen Versuchen mit der Fraktion $1a_2$, die später als P-3-Mc identifiziert werden konnte, die Feststellung, dass beim Eintrocknen dieser Fraktion im Vakuum-Exsiccator über Kieselgel 99% der Radioaktivität verschwunden waren. Wenn wir diese Substanzen nun in wässriger Lösung auf DC-Platten auftrugen, war bei der Wasserverdunstung mit Verlusten zu rechnen, was durch die feindisperse Verteilung der Substanzen am Sorptionsmittel noch begünstigt wurde. Auch das Abdampfen des Fliessmittels musste mit Substanzverlusten einhergehen.
Besonders stark waren die Verluste, wenn die aufgetragenen Basen in alkalischem Milieu gelöst wären. Folgender Versuch möge diesen Sachverhalt veranschaulichen: Auf eine DC-Platte wurden äquimolare Proben von Pyridinbasen in wässriger Lösung punktförmig aufgetragen. Im UV-Licht zeigten die Punkte gute Lichtabsorption. Wurde nun aber auf jeden Punkt ein Tropfen n/10 NaOH gegeben, dann konnte man, besonders beim P-3-Mc und 3-AP, beobachten, wie die UV-Absorption allmählich abnahm. Nicotinsäure und Nicotinsäureamid waren wenig flüchtig.
Wir hielten unsere Proben bei pH 5 und bewahrten unsere Platten nach der Entwicklung in der Kühltruhe auf.

Auch das Einengen der eluierten Pyridinbasen zum Zwecke der Rechromatographie bereitete uns einige Schwierigkeiten.

Waren die Proben mit n/10 HCl angesäuert, so blieben uns die Basen als Hydrochloride fast verlustlos erhalten, doch wanderten letztere bei der Chromatographie nicht. Wir waren also gezwungen, die Proben alkalisch zu machen, was, wie oben erwähnt, nachteilig war. Ansäuern mit Essigsäure oder Ameisensäure war ebenfalls ungünstig, da die Pyridinbasen mit diesen Säuren reagierten und im Rechromatogramm eine Vielzahl von Banden auftrat, die erst beim Einengen entstanden war. Schliesslich gelang es uns aber, die Banden aus dem ersten Chromatogramm für die Rechromatographie zu gewinnen. Wir eluierten die Banden mit Methanol. Das Eluat wurde am Vakuum bei Zimmertemperatur eingeengt und das Destillat mit Hilfe einer zwischengeschalteten Trockeneiskühlung aufgefangen. Von 3-AP waren 0,6%, von P-3-Mc 0,8% der Radioaktivität ins Destillat übergegangen.

f) Schwierigkeiten bei der Dünnschichtchromatographie

Wir hatten bei der Besprechung der Arbeitstechniken der Dünnschichtchromatographie erwähnt, dass das vorteilhafteste System für die Durchführung der Chromatographie das Sandwich-System ist, bei dem die Kammer nur eine Tiefe von 0,2 cm hat.
Tafel 5 zeigt die grössere Trennschärfe, die mit diesem System zu erzielen ist.
Dennoch zeigte sich, dass wir das Sandwichverfahren nicht bei allen Fliessmitteln verwenden konnten. So erschien bei dem stark hydrophoben Fliessmittel 5 für Pyridinbasen ein etwa 3 mm breiter Entmischungsstreifen im unteren Drittel der Platte, der die Trennung stark beeinträchtigte. Es war uns möglich nachzuweisen, dass

dieser Streifen von der in der Kieselgelplatte befindlichen Feuchtigkeit stammt, die von der Platte während des Auftragens und Chromatographierens aus der Luft adsorbiert wurde.
Wir gingen deshalb bei diesem Fliessmittel wieder auf die Chromatographie im Trog über, wodurch der Entmischungsstreifen zwar abgeschwächt, nicht aber verhindert wurde.
Wir konnten feststellen, dass an Tagen mit sehr geringer Luftfeuchtigkeit die Trennung ungestört verlief, während an Tagen mit hoher Luftfeuchtigkeit die Trennung - ganz besonders mit Fliessmittel 5, doch auch mit Fliessmittel 3 - beeinträchtigt war. Wir halfen uns dann so, dass wir mit den Fliessmitteln 1 + 2 chromatographierten, bei denen der Wassergehalt der Dünnschicht die Trennung nicht beeinflusste.
Wir gingen ausserdem dazu über, die Platten, die wir mit Fliessmittel 5 chromatographierten, stark zu aktivieren und bewahrten sämtliche Platten, die wir für hydrophobe Fliessmittel benötigten, im Trockenschrank bei 40°C auf.

Die TRT-Technik (=Trennung - Reaktion - Trennung) sollte die Frage klären, ob sich unsere Substanzen im feindispers verteilten Zustand an der DC-Platte während der Chromatographie verändern. Dabei werden von der aufzutrennenden Probe einige Tropfen punktförmig in einer Ecke der DC-Platte aufgetragen und zwar im Abstand von 3 cm von jeder der beiden benachbarten Seiten. Dann wird in beiden Richtungen unter den gleichen Bedingungen und mit dem gleichen Fliessmittel getrennt. Substanzen, die sich während des Entwickelns nicht zersetzen, müssen auf einer durch die Laufrichtung 1 und 2 gebildeten Diagonalen liegen (70). Substanzen, die sich während der Chromatographie chemisch verändern, erfüllen die/se Forderung nicht.

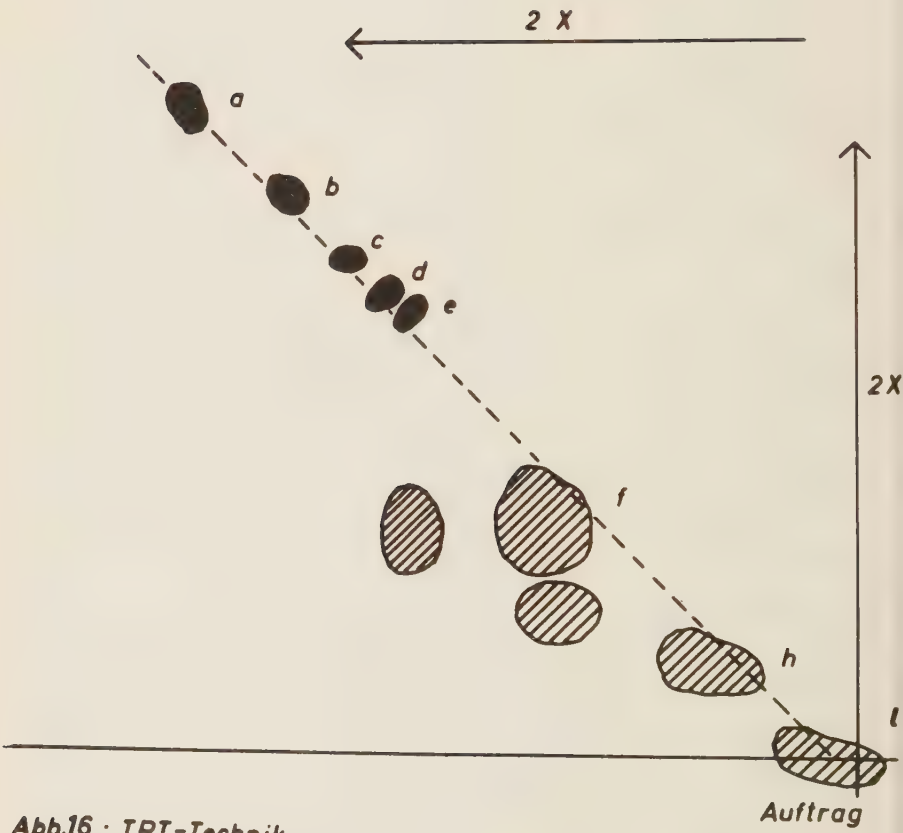


Abb.16 : TRT-Technik
Das Chromatogramm wird in 2 Richtungen je 2mal mit Fm.5 entwickelt. Bande f zersetzt sich etwas bei der Chromatographie; 2 Flecke liegen außerhalb der Diagonale.

Wir chromatographierten die Probe eines in-vitro-Ansatzes auf diese Weise mit Fliessmittel 5 und fanden, dass sich dabei Bande "f" geringfügig verändert. (Vgl.Abb. 16).

4. Dünnschicht-Chromatographie von säurelöslichen Nucleotiden und Pyridinbasen gemeinsam.

a) An Kieselgel H

K. RANDERATH (64,65) berichtete als erster über die dünnschicht-chromatographische Trennung von Nucleobasen, Nucleosiden und Mononucleotiden. - Danach ist die Trennschärfe bei der DC an feinpulvrigen Cellulose- und Kieselgel G-Schichten den papier-chromatographischen Verfahren überlegen. -
Wir chromatographierten zunächst mehrere säurelöslichen Nucleotide. Als Fliessmittel wählten wir das von RANDERATH (65) angegebene Fm.6 und das von MARKHAM & SMITH (54) zuerst beschriebene und von RANDERATH empfohlene Fm.7 (siehe Tafel 6a). Darüberhinaus erprobten wir ein in unserem Labor bei der PC benutztes Buttersäuregemisch für die DC.

Tafel (6a)

Fm.6	Fm.7	Fm.8
n-Butanol 70	ges.wässr.Ammoniumsulfatlsg. 80	Isobuttersäure 57
Aceton 50	----	----
Eisessig 30	1 m-Natriumcitrat 18	Wasser 39
50%ige Ammoniak 30	----	25%ige Ammoniak 4
Wasser 20	Isopropanol 2	----
Sm: K G_H	Sm: K G_H	Sm: K G_H
Laufstrecke: 10 cm Laufzeit: 150 min	Laufstrecke: 10 cm Laufzeit: 90 min	Laufstrecke: 5 cm Laufzeit: 120 min

Substanz	aufgetr. Menge	Fm.: 6 Rf x 100	Fm.: 7 Rf x 100	Trenn= schärfe	Fm.: 9 Rf x 100	Fm.: 10 Rf x 100	Trenn= schärfe	Fm.: 11 Rf x 100	Trenn= schärfe
3-AP	20 µg	85	85	scharf	10	38	scharf	90	scharf
P-3-Mc	20 µg	60	70	scharf	17	45	scharf	88	scharf
NS	20 µg	75	83	scharf	33				
NA	20 µg	80	86	scharf	28				
NAD	20 µg	32	45	scharf	32	71	scharf	63	scharf
NADP	20 µg	10	20	leicht geschweift	40	55	scharf	38	geschweift
3-APAP	20 µg	23	39		24				
P-3-McAD	10 µg	26	43		26				
AMP	10 µg	35	57	scharf	40	54	scharf	70	leicht geschweift
ADP	10 µg	17	25	scharf		63	scharf	60	
ATP	10 µg	8	15	geschweift	58	70	scharf	50	
CMP	5 µg	30	50	scharf		65	scharf	60	
UTP	5 µg	8	28	geschweift		85	scharf	40	

Tafel 7: Vergleich der Rf-Werte der von RANDERATH angegebenen Fließmittel 6 und 7 mit den Rf-Werten, die wir mit den von uns variierten Fließmitteln 9 und 10 erhalten.

Die erzielten Ergebnisse enttäuschten. Unsere Rf-Werte stimmten mit denen von RANDERATH überein, jedoch liegen diese so eng beisammen, dass im Gemisch keine scharfe Auftrennung zu erzielen ist, insbesondere, wenn die aufgetragene Menge einen Wert von 10 γ übersteigt.
Wir konnten jedoch die genannten Fliessmittel durch Hinzufügen einer bestimmten Methanolmenge verbessern. Diese musste für jedes Fliessmittel genau ermittelt werden. Mit diesen veränderten Fliessmitteln, die wir jetzt Fm.9, 10 und 11 nannten, erzielten wir weiter auseinanderliegende Rf-Werte. Fm.9 ist am meisten zu empfehlen und eignet sich auch für die Papier-Chromatographie (siehe Tafel 6 b).
Tafel 7 gibt einen Vergleich zwischen den Rf-Werten der ursprünglichen Fliessmittel und den von uns variierten.

Tafel (6b)

Fm.9	Fm.10	Fm.11
n-Butanol 70	ges.wässr.Ammoniumlösg.80	Isobuttersäure 57
Methanol 70	----	Wasser 42
Wasser 60	Wasser 35	Methanol 25
Aceton 50	Methanol 25	25%ige Ammoniak 5
5%ige Ammoniak 40	1 m-Na-citrat 18	----
Eisessig 30	Isopropanol 8	----
Sm: KG_H	Sm: KG_H	Sm: KG_H
Laufstrecke: 10 cm	Laufstrecke: 10 cm	Laufstrecke: 10 cm
Laufzeit: 90 min	Laufzeit: 120 min	Laufzeit: 145 min
S - Kammer	S - Kammer	S - Kammer

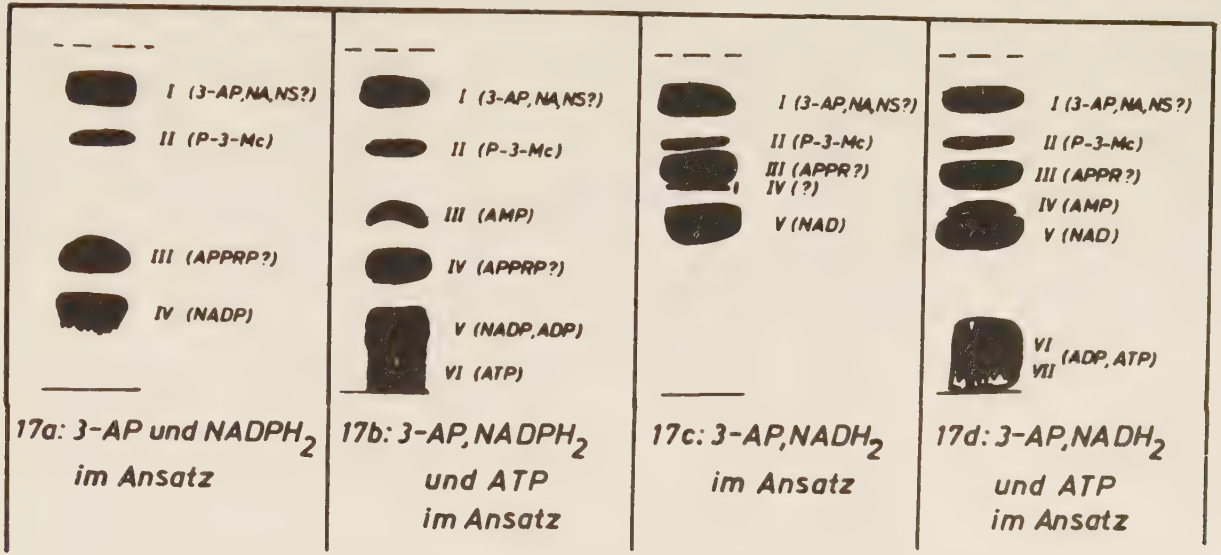


Abb. 17: DC verschiedener enteiweißter Ansätze mit Fm. 9 auf Kieselgel

Die Annahme, dass Lösungsmittel mit wenigen Komponenten die besten seien, trifft für die DC der Nucleotide nicht zu. Beim Weglassen einer Komponente wird das Trennergebnis verschlechtert.
Die Ergebnisse in Tafel 7 zeigen, dass es uns nicht möglich war, alle Komponenten eines Gemisches vieler säurelöslicher Nucleotide scharf voneinander zu trennen, wie es mit der Ionenaustausch-Chromatographie weitgehend möglich ist. Dagegen gelingt es, mit den einfachen Mitteln der DC die einzelnen Nucleotidgruppen, wie etwa die Adenosin-, Cytidin- oder Uridinphosphate, aufzutrennen. Darüber hinaus haben wir in der DC der Nucleotide ein einfaches und schnelles Verfahren, mit dem die Fraktionen aus der Ionenaustausch-Chromatographie weiter aufgetrennt werden können. Auf die Trennung von NAD und NADP mit der DC sei nochmals hingewiesen. (siehe Tafel 7 und Abb. 17).

Der Versuch einer gleichzeitigen Trennung von Nucleotiden und Pyridinbasen soll hier als Beispiel angegeben werden: Wir fügten verschiedene Cofermente Ansätzen von 3-AP mit einer Leberpräparation (Überstand 3000 g) hinzu (vgl. Abb. 17). Die Ansätze wurden enteiweisst und mit Fm.9 chromatographiert. Die Pyridinbasen wurden wie bei der Papier-Chromatographie nur in zwei Banden aufgetrennt. Sie enthielten 3-Acetylpyridin (3-AP), Pyridin-3-Methylcarbinol (P-3-Mc), Nicotinsäure (NS), Nicotinsäureamid (NA) und Substanz "f" (auf diese Substanz wird S. 47 näher eingegangen).
Bande III war ein Spaltprodukt von NAD bzw. NADP.
Bande III_{NAD}, das Spaltprodukt von NAD, hatte einen grösseren Rf-Wert als Bande III_{NADP}, das Spaltprodukt von NADP (vgl.Abb.17a und b). Die Form der UV-Spektren ähnelte sich sehr, doch sind die Minima und Maxima im

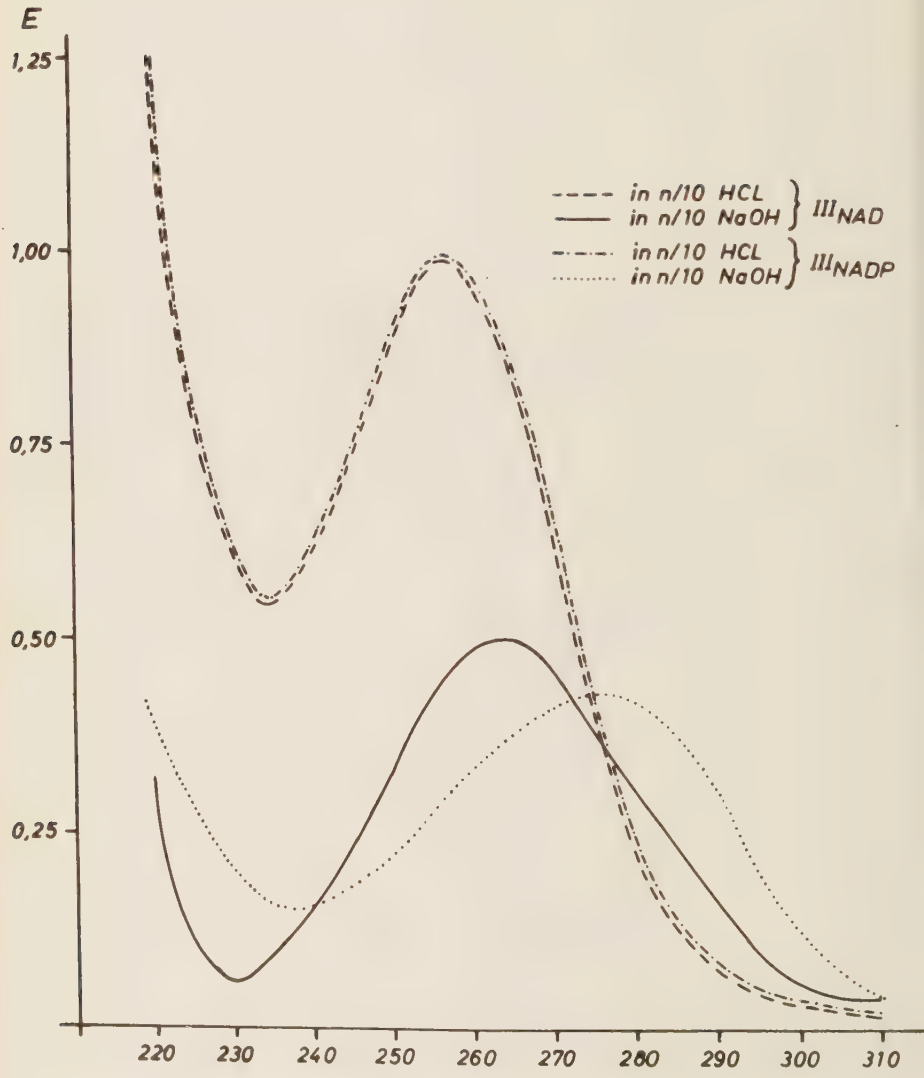


Abb. 18: UV-Spektren von Bande III_{NAD} und Bande III_{NADP}

Alkalischen gegeneinander verschoben (vgl. Abb. 18). Die beiden Substanzen enthalten Adenin und nicht substituierte Ribose. Diese wurde mit einem Sprühreagens nachgewiesen: 930 mg Anilin und 1,66 g Phtalsäure wurden in einem n-Butanol/H_2O-Gemisch (86:14) aufgenommen. Damit wurden die Chromatogramme besprüht, bis ein leichter Seidenglanz auftrat. Dann wurden die Platten 10 Minuten bei 105° C im Trockenschrank erhitzt. Substanzen mit freier Ribose färbten sich braun, auf unseren Chromatogrammen Bande III_{NAD} und Bande III_{NADP}. Wir nehmen an, dass es sich bei ersterer um Adenosin-5-diphosphatribose (APPR), bei letzterer um Adenosin-2'-phosphat-5-diphosphatribose (APPRP) handelt.

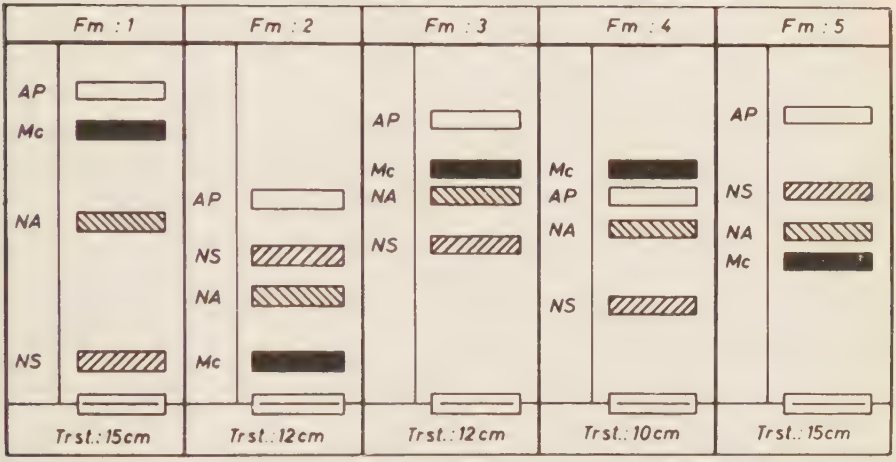
b) An DEAE-Zellulose und Anionenaustauscher ECTEOLA.

Die Platten stellten wir nach der Vorschrift von K.RANDERATH (64) her. Die Zellulosepulver müssen zuerst einem langwierigen Reinigungsprozess unterzogen und dann mit Collodium als Bindemittel versetzt werden. Die Platten werden selten so gut wie die mit Kieselgel. Ihre Kapazität ist gering und ihre Empfindlichkeit gegen die geringsten Beimengungen von Salzen gross. Die Trennung vor allem im Gemisch ist nicht besser als die oben auf Kieselgel geschilderte. Wir können aus diesen Gründen die Methode nicht empfehlen.

5. Dünnschicht-Chromatographie der Pyridinbasen.

Wir hatten gezeigt (s.S. 28), dass es uns auch mit der DC nicht gelungen war, Nucleotide und Pyridinbasen gleichzeitig befriedigend zu trennen. Für die Fragestellung dieser Arbeit war jedoch die gute Auftrennung der Pyridinbasen das Wesentliche. Daher verzichteten wir auf die Chromatographie der Nucleotide und wählten Fliessmittel, in denen die Nucleotide unlöslich waren und deshalb am Start als eine Bande liegen blieben. Diese Bande nennen wir "Auftragbande" oder verkürzt "Auftrag".

Fm.5 stammt von GÄNSHIRT und MALZACHER (25). Sie chromatographierten damit Vitamine der B-Gruppe. Bei mehrmaliger Entwicklung eines Chromatogramms mit diesem Fliessmittel und einer Trennstrecke von 15 cm erzielten wir ausgezeichnete Trennungen. Die Schichten wurden für dieses Fliessmittel aktiviert. Von NÜRNBERG (60) übernahmen wir Fm:4, mit dem wir auf luftgetrockneten Platten bei einer Trennstrecke von 10 cm chromatographierten.
Gute Trennungen erzielten wir auch mit den von STAHL und SCHORN (70) angegebenen Fliessmitteln 2 und 3. Für diese beiden Fliessmittel stellten wir die Kieselgel H-Schichten nicht mit Wasser, sondern mit einer 0,1 m Natriumacetatlösung (79) her und liessen sie an der Luft trocknen.
Für beide Fliessmittel war eine Trennstrecke von 12 cm am günstigsten.
Die Konzentration der einzelnen Fliessmittelkomponenten ist im Volumverhältnis angegeben (siehe Tafel 6c).



Zeichenerklärung: 3-AP ▭ ; P-3-Mc ▬ ; NA ▨ ; NS ▨ ;
Nucleotide ▭ ; Trst. = Trennstrecke in cm.

Abb. 19: Fleckenkarte der mit den fünf Fließmitteln getrennten Pyridinbasen.

Substanzen	Fm:1 Rf x 100	Fm:2 Rf x 100	Fm:3 Rf x 100	Fm:4 Rf x 100	Fm:5(a) Rf x 100	Fm:5(b) Rf x 100
3-AP	86	56	78	58	67	80
P-3-Mc	75	13	65	65	34	40
NS	10	40	44	27	43	57
NA	50	30	59	50	36	48

Fm:5(a) 1mal entwickelt
Fm:5(b) 2mal entwickelt

Tafel 8: Rf-Werte von 3-AP, P-3-Mc, NS und NA bei Chromatographie mit unseren fünf Fließmitteln. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus jeweils 10 Versuchen.

Tafel (6c)

Fm 1: Äthanol 50 - Chloroform 40 - Aceton 10

Fm 2: Äthylacetat 80 - Methanol 10 - Ameisensäure 5

Fm 3: Äthylacetat 75 - Methanol 20 - Essigsäure 5

Fm 4: n-Propanol 95 - 10%iger Ammoniak 5

Fm 5: Benzol 70 - Methanol 20 - Aceton 5 - Eisessig 4

Bei den oben beschriebenen konstant eingehaltenen Bedingungen schwankten die Rfx100-Werte um $\pm$ 7. Tafel 8 gibt Mittelwerte aus je 10 Versuchen mit reinen Testsubstanzen wieder. Abb.19 ist die dazugehörige Fleckenkarte und zeigt, wie unterschiedlich die einzelnen Pyridinbasen in den fünf Fliessmitteln laufen und wie sich diese ergänzen.

6. Dünnschicht-Hochspannungs-Elektrophorese:

Als die Herstellung dünner Schichten mittels feinkörniger Sorptionsmittel durch die Arbeiten von E. STAHL keine Schwierigkeit mehr bot, griffen PASTUSKA und TRINKS (61,62) die Dünnschicht-Elektrophorese auf. Es ergab sich, dass dünne, feinkörnige Trägerschichten aus Cellulose dem bisher verwandten Elektrophoresepapier überlegen sind.

Wir versuchten mit Erfolg die Dünnschicht-Hochspannungs-Elektrophorese.

Ursprünglich hatten wir nur vor, auf diese Weise das elektrochemische Verhalten von 3-AP, P-3-Mc, NA und NS zu studieren. Interessehalber wurden auch NAD, $NADH_2$, NADP, $NADPH_2$, 3-APAD und P-3-Mc-AD aufgetragen.

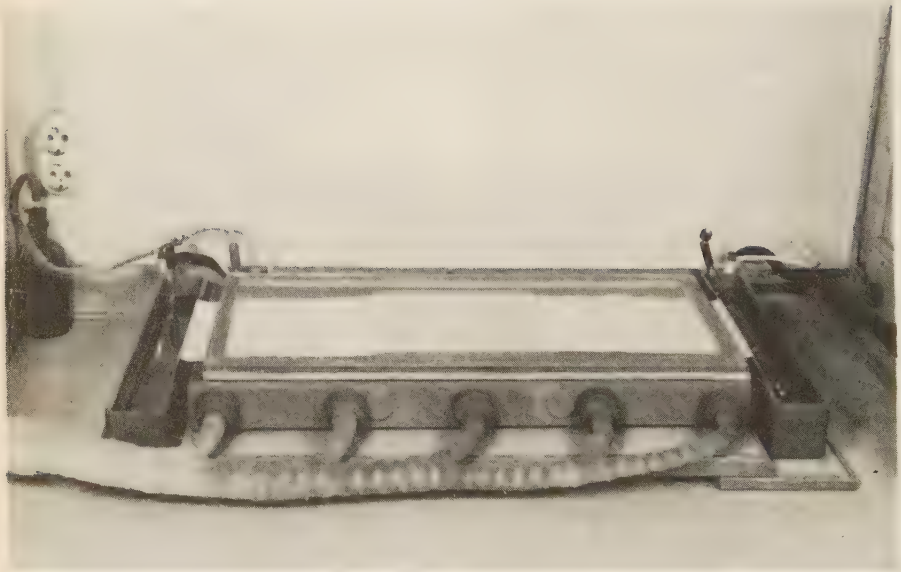


Abb.20: Anordnung für die Dünnschicht-Hochspannungs-Elektrophorese.

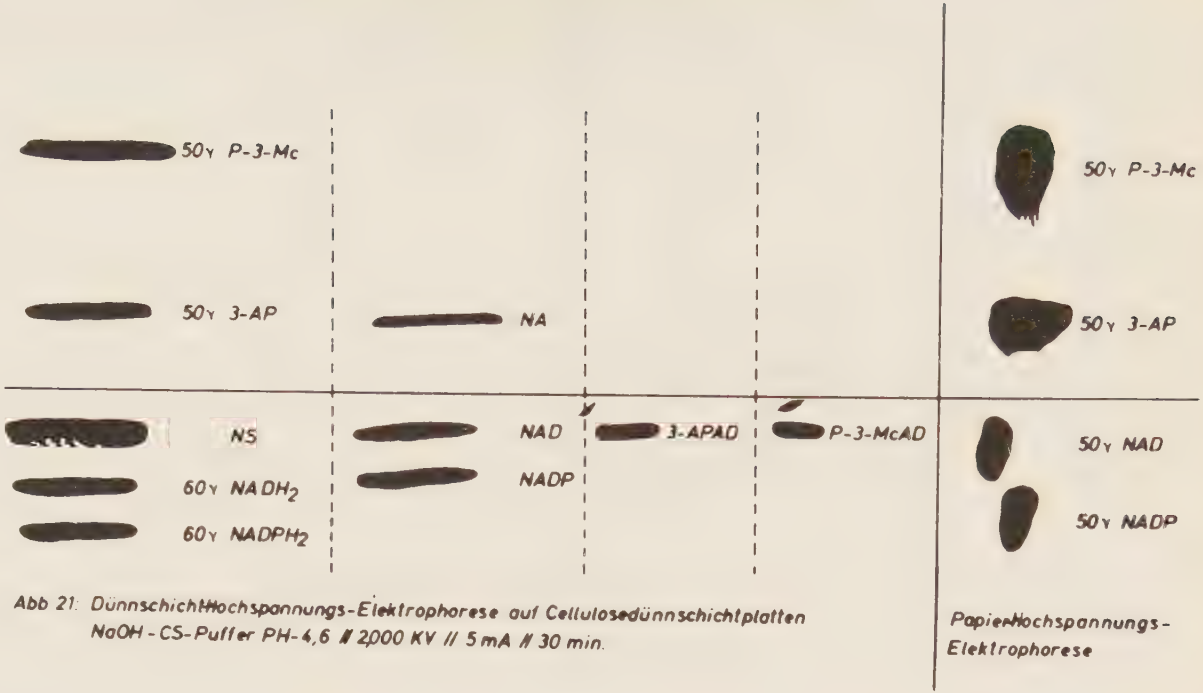


Abb 21: Dünnschicht-Hochspannungs-Elektrophorese auf Cellulosedünnschichtplatten
NaOH - CS-Puffer PH-4,6 // 2,000 KV // 5 mA // 30 min.

Papier-Hochspannungs-
Elektrophorese

Wir verwendeten zur Herstellung der Schichten Cellulose MN 300 und versetzten die Cellulose gleich mit dem Elektrophoresepuffer (15).

Mit dem Puffer 0,05 m $\frac{1}{5}$ Citronensäure: 0,1 n NaOH $p_H^{4,6}$: 4 (Volumanteile)

erzielten wir die besten Trennungen.

Die Platten wurden 40 Minuten an der Luft liegengelassen, bis ihr feuchter Glanz matt war. Dann wurden auf der Plattenmittellinie die Substanzen aufgetragen und die Platte in die auf $-10^{o}C$ gekühlte Hochspannungskammer gelegt. Nach 20 min wurde eine Hochspannung von 2.000 KV bei einem Stromfluss von 5 mA 30 min lang angelegt. Abb.20 zeigt die Elektrophoresevorrichtung, Abb.21 ein Chromatogramm. Die Trennung war so scharf, wie man sie auf Papier nie erhielt.

Pyridin-3-methylcarbinol wanderte am weitesten gegen die Kathode, ist also die stärkste Base.

II. Art der Zellfraktionierung und Durchführung der in vitro-Versuche.

1. Gewebegewinnung und Zellfraktionierung

Unsere Versuchstiere waren Ratten vom Stamm Sprague Dawley. Sie waren meist von unterschiedlichem Alter und Gewicht.

Nach Dekapitation der Tiere durch Scherenschlag wurden sofort Leber, Gehirn und Nieren mit gekühlten Instrumenten entnommen. Leber und Niere wurden entweder durch ein gekühltes Plastiksieb gerieben oder mit einer Rasierklinge rasch in kleine Stücke zerschnitten und in die Röhre des Homogenisators gestrichen, der bereits in einem eishaltigen Gefäss fixiert und austariert auf der Waage stand.
Wir benützten jeweils 2 g Gewebe auf 8 ml der unten angegebenen Lösung. Gehirne gaben wir in toto in die Röhre des von uns benützten Potter-Elvehjem-Homogenisators aus Plexiglas mit einer Bohrung von 2,1 cm Durchmesser. Der Stempel wurde von einem Elektromotor mit 1500 U/min rotiert. Die Vertikalbewegung erfolgte manuell durch Senken und Heben des Kühlgefässes. Die Suspension sollte den Stempel etwa 10 mal in jeder Richtung während 30 sec. passieren.
Das Homogenat, das wir mit 3 ml einer Lösung von 1,15 %iger KCl, 5,5 %iger Glucose und 0,15 molarem Sörensen-Phosphatpuffer pH 7,4 im Volumverhältnis 77:3:20 pro Gramm Gewebe herstellten, benützten wir

für Versuche, bei denen es uns nicht auf die Überprüfung der Fermentaktivität einzelner Zellfraktionen ankam. Wir gewannen daraus verschiedene Leberpräparationen:

a) Den"Überstand 2000 g" - bei ihm waren Kerne und Zellreste durch Zentrifugieren mit 2000 g bei 0°C für 15 min Dauer in der Phywe-Präparationszentrifuge "Eispirouette" abzentrifugiert worden.

b) Den "Überstand 10.000 g" - bei ihm waren auch die Mitochondrien durch Zentrifugieren mit 10.000 g bei 0°C für 20 min Dauer entfernt worden.

c) Den "Überstand 100 000 g" - er war auch frei von Mikrosomen und enthielt reines Zellplasma.

Die Mitochondrien- und Mikrosomenfraktion gewannen wir nach dem von BRODY und BAIN (8), MAIBAUER und HERKEN (53), sowie COPER, HELGE und HERKEN (17) ausgearbeiteten Verfahren.
Das Homogenat für die Zellfraktionendarstellung wurde mit 20 ml 0,25 molarer Saccharose pro Gramm Gewebe hergestellt.

2. Versuchsablauf

Die Gewebepräparation vereinigten wir zum Ansatz mit Puffer vom gewünschten pH, der bereits Substrate und Cofermente enthielt. So wurde die Reaktion gestartet. Ein Ansatz sah zum Beispiel so aus:

0,7 ml	"Überstand 2000 g"
0,8 ml	Sörensen-Phosphatpuffer enthaltend: 20 µmol-6-phosphat, 20 µmol $NADH_2$ und 20 µmol 3-AP

pH des Ansatzes 7,3

Ansätze von 3 ml und mehr inkubierten wir in Warburggefässen unter ständigem Schütteln bei 40°C. (siehe Kap.D.III S. 58). In Versuchen mit den teuren Cofermenten mussten die Ansätze sehr klein gehalten werden, meist um 1 ml. Dafür benutzten wir "Wassermannröhrchen", die ebenfalls während des Inkubierens mit Hilfe einer besonderen Haltevorrichtung ständig geschüttelt wurden. Die Reaktion unterbrachen wir durch 1 min Eintauchen der Röhrchen in kochendes Wasser. Die Röhrchen waren dabei gut verschlossen, so dass wir bei kurzfristigem Erhitzen der kleinen Röhrchen mit keinem Verlust an wasserdampfflüchtigen Basen rechnen mussten. Danach wurde das ausgefällte Eiweiss abzentrifugiert und sein N-Gehalt bestimmt. Der Überstand wurde ohne jede weitere Manipulation auf DC-Platten zur Chromatographie aufgetragen.

3) Versuche mit Isocitrico-Dehydrogenase (ICDH)

Untersuchungen mit diesem Enzym wurden auf zwei Arten ausgeführt.

a) Einerseits wurden die Bedingungen unserer in vitro-Versuche mit Gewebepräparationen übernommen. Die ICDH trat an die Stelle der Gewebepräparation. Für erste orientierende Versuche benützten wir

Ansatz (1):

0,7 ml Trispuffer (pH 7,4; 0,1 molar),
dem nach Angaben von SIEBERT noch
Äthylendiamintetraessigsäure ÄDTE (10^{-5}m) zugefügt
war, um das Ferment vor Schwermetallen zu schützen.

0,1 ml 3-AP (8,3 µmol)
0,1 ml $MnSO_4$ (im Gesamtansatz 5 . 10^{-4}molar)
0,05 ml $NADPH_2$ (5 µmol)
0,05 ml ICDH (450 Einheiten nach BÜCHER) in Glycerin

Wir inkubierten 120 min bei 40°C in Wassermann-Röhrchen. Der enteiweisste Ansatz wurde in üblicher Weise mit der DC chromatographiert.

Ansatz (1) wurde weiter variiert, bis wir eine optimale P-3-Mc-Ausbeute erzielten:

Ansatz (2):

0,7 ml Tris (pH 7,4) mit ÄDTE
0,1 ml $MnSO_4$
0,1 ml $NADPH_2$ (10 µmol)
0,1 ml 3-AP (5 µmol)
0,05 ml ICDH (400 E)

b) Andererseits wurden spektralphotometrische Untersuchungen gemacht. Die Zusammensetzung dieser Ansätze wurde von SIEBERT und Mitarbeitern (69) übernommen. Ansatz (3) ist für die OSAR-Reaktion (s.S.61) angegeben und wurde insofern abgewandelt, als die Stelle des

Oxalsuccinats von 3-AP eingenommen wird.

Ansatz (3) :

0,1 molarer Tris-Puffer; er enthielt Äthylendiaminessigsäure von 0,001 m	1,0 ml
0,02 m $MgSO_4$	0,3 ml
0,0015 m $NADPH_2$ in Tris pH 7,4	0,15 ml
0,015 m 3-AP	0,4 ml
150 Einheiten Enzym	0,05 ml

Der Ansatz wurde mit Wasser auf 3 ml gebracht und auf pH 7,4 eingestellt. Der Leerwert enthielt alle Komponenten ausser $NADPH_2$ und die Kontrollküvette alle Substanzen mit Ausnahme des Substrates, nämlich 3-AP.

Um zu klären, ob 3-AP die eigentlichen ICDH-Reaktionen beeinflusst, führten wir nach Angaben von SIEBERT (69,7) die"OCHOA-Reaktion" einmal mit, einmal ohne 3-AP-Zugabe durch:

Ansatz (4) :

Probe (A)	Probe (B)
1,5 ml 0,1 m Tris-Puffer (pH 7,4)	1,0 ml 0,1 m Tris-Puffer
0,2 ml 0,02 m $MnSO_4$	0,5 ml 0,1 m 3-AP gelöst in Tris
0,5 ml 0,0015 m $NADPH_2$	sonst wie Probe (A)
0,5 ml 0,1 m α-Ketoglutarat	
0,5 ml 0,1 m Na H CO_3	
0,01 ml Enzym (Firma BOEHRINGER)	

Der Ansatz wurde ebenfalls auf 3 ml gebracht und auf pH 7,4 eingestellt. Die Proben wurden unmittelbar vor der Reaktion gründlich mit CO_2 begast und die Reaktion durch Zugabe des Enzyms gestartet. Das Verschwinden der UV-Absorption des $NADPH_2$ wurde bei einer Wellenlänge von 340 mμ gegen eine Leerwertküvette gemessen, die jeweils alle Reagenzien von Probe (1) bzw. (2), ausser dem Coferment, enthielt.

4. Praeparate, Chemikalien

a) Pyridinbasen

3-AP	Fa.Raschig,Ludwigshafen/Rhein
3-AP tritiummarkiert.	Die Synthese wurde von KORANSKY, SCHULZE u.MÜNCH bei der Schering AG bzw. im Pharmakologischen Institut durchgeführt.
P-3-Mc	im eigenen Labor hydriertes 3-AP
Nicotinsäureamid	Fa.Merck
Nicotinsäure	Fa.Hoffmann-La Roche

b) Nucleotide

AMP, ADP und ATP NAD, NADP und reduzierte Cofermente	Fa.Boehringer & Soehne
3-APAD	Fa.Sigma (Chemical Company)USA
P-3-Mc-AD	Die Synthese verdanke ich Herrn Priv.-Doz.Dr.H.COPER (Pharmakologisches Institut)

c) Dünnschichtchromatographie

Kieselgel G nach STAHL	Fa.Merck
" H " "	" "
Neatan neu	" "
MN Cellulosepulver 300 nach STAHL	Fa.Macherey, Nagel & Co
MN Cellulosepulver 300 DEAE	" " " "
MN Cellulosepulver 300 Ecteola	" " " "
Fließmittel aus Chemikalien	(pro analysi) der Fa.Merck

Isocitrico-Dehydrogenase

α) Ein Präparat der Firma C.F.BOEHRINGER & SOEHNE GMBH.
Es wurde aus Schweineherz nach der Methode von SIEBERT und Mitarbeitern gewonnen und wird in 50 %igem Glycerin lyophilisiert angeboten.

Weitere Eigenschaften:

Spezifische Aktivität: ca 1,8 Einheiten/mg oder
100 BÜCHER Einheiten/mg

Fremdaktivitäten bezogen auf die spez.Aktivität des ICDH:
Aconitase und NAD-spezifische ICDH je < 0,2%
Molekulargewicht: 61.000, isoelektrischer Punkt: pH 7,4
pH Optimum: pH 7,4 - 7,6.

β) Ein Präparat der SIGMA Chemical Company
Type I, Crude
NADP specific in systems tested
1 Unit = O.D. of 0,01/min in 3 ml reaction mix.

Dieses Präparat lösten wir ebenfalls in 50 %igem Glycerin oder nahmen es in Trispuffer auf, in dem es sich jedoch nicht so gut löste.

Sonstiges

Glucose-6-phosphat	Firma BOEHRINGER
p-Chlormercuribenzoat	Firma FERAK (Berlin)
α-Ketoglutarat	" " "

D : E R G E B N I S S E

I : Isolierung und Identifizierung von Stoffwechselprodukten des 3-Acetylpyridin.

a) Versuche mit $NADH_2$ als Coferment

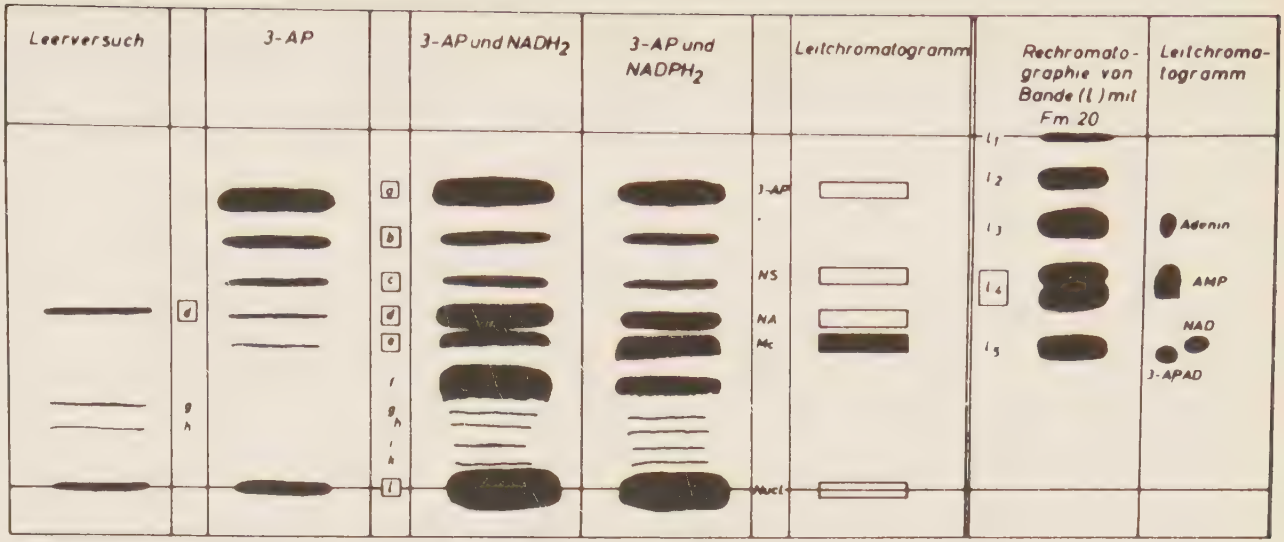
Das von uns verwendete 3-AP (siehe Liste der Präparate S. 37) enthielt Verunreinigungen. Es handelte sich um zwei Pyridinbasen, die sich mit dem König-Reagens anfärben liessen. Mit Fm.5 liefen diese beiden Basen vor dem 3-AP, also fast in der Fliessmittelfront. Auf die erste entfielen 2,1%, auf die zweite 5,7% der Gesamtextinktion des 3-Acetylpyridintests. Im Folgenden wird auf diese Verunreinigungen nicht mehr eingegangen.

In orientierenden Versuchen hatten wir festgestellt, dass $NADH_2$ als Coferment für die Hydrierung des P-3-Mc benötigt wird. Deshalb fügten wir unseren Ansätzen mit einer Leberpräparation dieses Coferment zu und arbeiteten zunächst mit einem Überschuss von 3-AP.

Der Ansatz hat folgende Zusammensetzung:

Überstand 10 000 g	0,3 ml
Sörensen-Phosphatpuffer	0,2 ml
enthaltend: $NADH_2$ (5µ mol) und 3-AP (8,3µ mol)	
Gesamter Ansatz pH 7,4	0,5 ml

Der Ansatz wurde 120 Minuten bei 40°C inkubiert.



Trennstrecke 15 cm, zweimalige Entwicklung mit Fließmittel 5. Umrahmt sind die KOENIG-positiven Banden, z B ⓓ

Abb. 22: DC-Chromatogramme von Versuchen mit der Leberpräparation: Überstand 10 000 g.
Ansätze mit 3-AP oder 3-AP + $NADH_2$ oder 3-AP + $NADPH_2$

Die enteiweisste Probe wurde dann auf DC-Platten mit Fm:5 zweimal entwickelt. 0,2 ml waren in einer Breite von 10 cm und auf jeder Platte ausserdem die vier Testsubstanzen 3-AP, P-3-Mc, NS und NA aufgetragen worden.
Wir erhielten sechs scharf getrennte Banden, die wir mit (a) bis (f) bezeichneten. Im Leerversuch (im Ansatz kein 3-AP und $NADH_2$) erschien nur eine schwache Bande (d) (vgl.Abb.22).

Bande (a) :

Diese Bande lief mit allen fünf Fliessmitteln auf Höhe des 3-AP und ergab auch dessen Spektrum. Bei Rechromatographie mit Fm:4 trennte sich eine zweite Bande (a_2) ab, die 10% der (a)-Bande ausmachte. Diese Bande konnten wir nicht identifizieren. Bei Versuchen mit Tritiummarkiertem 3-AP enthielt Bande (a_2) keine Radioaktivität.
Bande (a) enthält also zu 90% 3-Acetylpyridin.

Bande (b) :

Diese Bande trat bei allen Versuchen etwa in derselben Stärke auf. Sie lief bei einem Rf x 100 von 70 und mit keiner Testsubstanz zusammen. Ihr Spektrum konnten wir zunächst nicht einordnen. Bei saurem pH ($\frac{n}{10}$ HCl) hatte sie ein Maximum bei 275 mμ und ein Minimum bei 235 mμ , bei alkalischem pH n/10 NaOH ein Maximum bei 305μ und ein Minimum bei 245 mμ .
Dieses Spektrum glich dem der Fraktion 1c, die KANIG (33) aus dem Gehirn 3-AP vergifteter Ratten isoliert hatte (vgl.Abb.23).

Kürzlich hat nun NEUHOFF (59) aus dem Urin 3-AP vergifteter Ratten eine Substanz isoliert, deren UV-Spektrum mit dem unserer Bande (b) fast identisch ist. NEUHOFF identifizierte diese Substanz als 3-Acetyl-

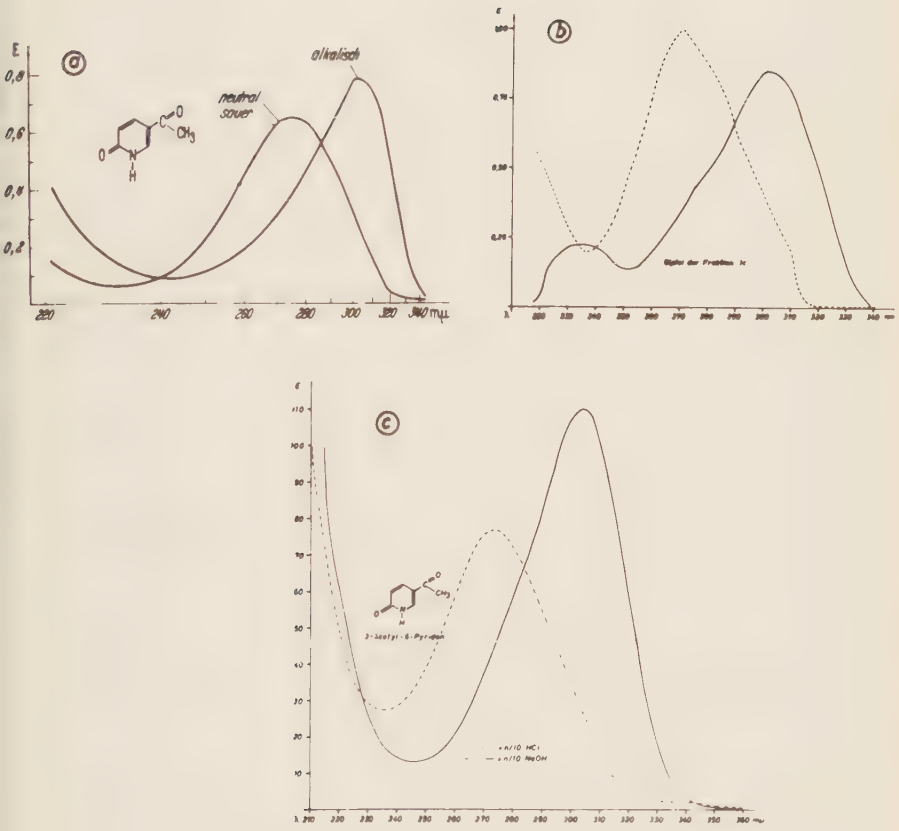


Abb. 23: UV-Spektren von 3-Acetyl-6-pyridon (NEUHOFF) ⓐ Fraktion 1c (KANIG) ⓑ und Bande b aus unseren Chromatogrammen ⓒ

pyridon. NEUHOFF gibt ein alkalisches Maximum von 312 mμ an; dagegen lag sowohl bei KANIGs Fraktion 1c wie auch bei allen Versuchen, in denen wir die Bande (b) rechromatographiert untersuchten, das alkalische Maximum immer bei 305 mμ. - Wir schrieben unsere UV-Spektren bei einer Alkalität von n/10 NaOH (vgl. Abb.23). Kein bisher bekannter Metabolit des 3-AP zeigt eine so starke Verschiebung des Maximums beim Übergang vom Sauren ins Alkalische. Deshalb scheint uns die Annahme berechtigt, dass sowohl die Fraktion 1c der Chromatographie von KANIG wie auch Bande (b) unserer Chromatogramme mit dem von NEUHOFF identifizierten 3-Acetyl-6-pyridon identisch ist.

Die Entstehung von 3-Acetyl-6-pyridon in unseren Ansätzen musste von der Hydrierung des 3-AP zum P-3-Mc unabhängig sein. Versuche, die wir mit einer Leberpräparation und 3-AP ohne hydrierendes Coferment durchführten, bestätigen diese Annahme: Während Bande (a) und (b) imponierten, waren Bande (c), (d) und (e) nur sehr schwach (vgl.Abb.22 und Tafel 13).

Das in Bande (b) enthaltene 3-Acetyl-6-pyridon war also der Hauptmetabolit des 3-AP, wenn unseren Ansätzen kein hydrierendes Coferment hinzugefügt worden war.

Mit Tritium-markiertem 3-AP liess sich nachweisen, dass die in Bande (b) enthaltene Substanz ein Metabolit des 3-AP ist. Das Radiogramm liess über Bande (b) hohe Radioaktivität erkennen (vgl. Abb.24). Eigenartigerweise fanden wir im 3-Acetyl-6-pyridon eine bedeutend niedrigere spezifische Aktivität, als sie das inkubierte 3-AP hatte. Die spezifische Aktivität ermittelten wir nach der Formel:

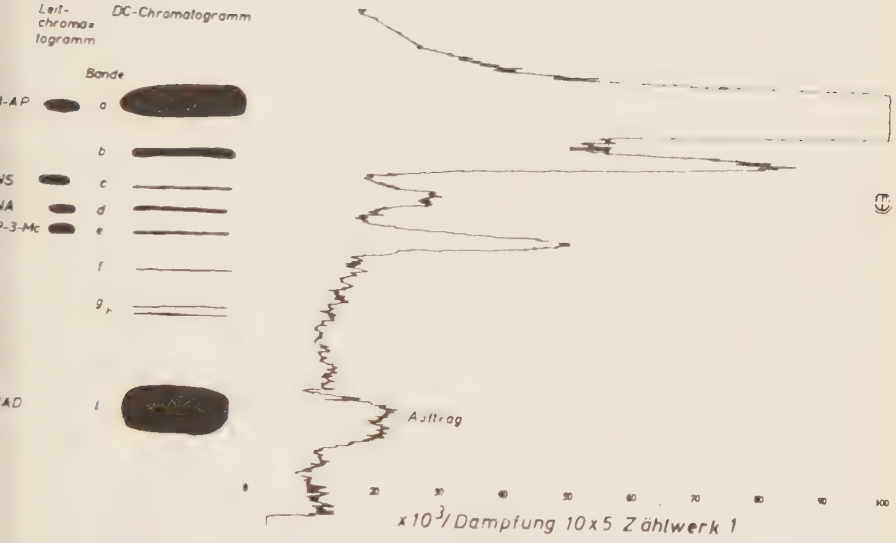


Abb. 24: Radiogramm eines Ansatzes mit der Leberpräparation; Überstand 10000g und 3-AP ohne hydrierendes Coferment. (Vollausschlag = 1 x 10^3 Jpm; Dämpfung 10 x 5 = 50 sec.; Zählwerk = Untersetzung der Impulszahl Faktor 1)

spezifische Aktivität = $\frac{\text{I.p.m. x E spez.}}{E_{260}}$

(I.p.m. = gemessene Impulse in 1 ml pro Minute; E_{260} = Extinktion in 1 ml in n/10 HCl; E spez. = spezifische Extinktion = E_{260} in n/10 HCl pro μ mol)
Für 3-AP war E spez. x 1000 = 4500/μ mol. Für 3-Acetyl-6-pyridon konnten wir die spezifische Extinktion nicht bestimmen, da uns nicht genügend Substanz zur Verfügung stand. Da das saure Maximum von 3-AP-6-pyr bereits ins Langwellige verschoben ist, ist die spezifische Aktivität wahrscheinlich kleiner als die von 3-AP. In Tafel 9 ist daher nur die Aktivität pro Extinktionseinheit (I.p.m./E_{260}) für 3-AP und 3-A-6-pyr angegeben. Die Werte stammen von Bande (a) und Bande (b), die jeweils aus demselben Dünnschicht-Chromatogramm eluiert wurden. Dies hatte den Vorteil, dass beide Substanzen erst verglichen wurden, nachdem sie dem Prozess der Inkubation und Chromatographie ausgesetzt waren. Es ist nämlich denkbar, dass im Ansatz Tritium gegen Wasserstoff ausgetauscht wird.
Wir fanden als Mittelwert aus fünf Versuchen für das 3-Acetyl-6-pyridon eine Aktivität pro Extinktionseinheit von
$\bar{x}$ = 47 + 12% der Aktivität des 3-Acetylpyridin (siehe Tafel 9
Die spezifische Aktivität von 3-A-6-pyr muss aus oben angegebenen Gründen im Vergleich zu 3-AP noch niedriger sein. Schon KANIG war bei der Untersuchung seiner Fraktion 1c dieser Sachverhalt aufgefallen. Er ist entweder so zu erklären, dass bei der Oxydation des Pyridinringes nicht nur eines, sondern mehrere H-Atome ausgewechselt werden, oder dass bei dem von uns angewandten Tritium-markierten 3-AP nicht alle H-Atome gleichmässig gegen Tritium ausgetauscht waren, sondern etwa nur das H-Atom in Stellung 6 und Stellung 2 des Pyridinrings.
Auch Bande (b) war nicht einheitlich:

Versuch	Substanz	Impulse/min pro 1 ml	$E_{260} \times 1000$ pro 1 ml	I.p.m/ E_{260}	II/I . 100
1	3-AP	8.353.000	45.050	185 I	44 %
	3-AP-6-Pyridon	194.700	2.360	82 II	
2	3-AP	7.315.000	43.900	166 I	52 %
	3-AP-6-Pyridon	193.000	2.230	87 II	
3	3-AP	8.062.500	45.580	177 I	47 %
	3-AP-6-Pyridon	176.000	2.100	84 II	
4	3-AP	10.865.500	62.650	173 I	38 %
	3-AP-6-Pyridon	142.750	2.150	66 II	
5	3-AP	10.217.500	56.820	180 I	58 %
	3-AP-6-Pyridon	227.500	2.150	105 II	

$\bar{X} = 47 \pm 12$ %

Tafel 9: Vergleich der Aktivität pro Extinktionseinheit von 3-Acetylpyridin mit der von 3-Acetyl-6-pyridon.

Bei der Rechromatographie mit Fm:4 trennte sich bei Versuchen mit NAD eine zweite fast ebenso starke Bande (b_1) ab. In Versuchen mit Tritium-markiertem 3-AP war (b_1) nicht markiert, während die gesamte Radioaktivität auf (b_2) entfiel, welches das typische 3-Acetyl-6-pyridon-Spektrum aufwies.

Bande (c):

Bande (c) war eine schmale, jedoch gut sichtbare Bande, die nach zweimaliger Chromatographie mit Fm:5 bei einem Rf x 100 von 60 lief. Wir sammelten diese Bande aus mehreren Versuchen.

Mit dem König-Farbtest färbte sie sich wie die Nicotinsäure rötlich. Bei der Rechromatographie mit Fm:4 trennte sie sich in drei Banden (c_1), (c_2) und (c_3) auf, wobei (c_1) = 25 %, (c_2) = 10 % und (c_3) = 65 % der UV-Absorption der (c)-Bande ausmachten. (c_1) und (c_2) berücksichtigten wir nicht weiter. (c_3) lief in Höhe der Nicotinsäure, gab ein typisches Nicotinsäurespektrum und lief auch in den weiteren drei Fliessmitteln mit Nicotinsäure zusammen.

Es kann daher angenommen werden, dass der Hauptanteil der in Bande (c) enthaltenen Substanzen Nicotinsäure ist.

Versuche mit Tritium-markiertem 3-AP ergaben hinsichtlich der Nicotinsäure-Bande andere Ergebnisse. Diese Bande war nur noch sehr schwach ausgeprägt, wenn wir anstelle des unmarkierten 3-AP Präparates der Firma Raschig Tritium-markiertes 3-AP benützten (siehe Tafel 10). Die Versuchsbedingungen waren jeweils dieselben geblieben. Über der sehr schwachen Nicotinsäure-Bande wurde im Radiogramm eine geringe Impulszahl registriert (vgl. Abb. 24 + 25).

Versuch	eingesetztes 3-AP		entstandene Nicotinsäure		% Nicotinsäure	
	E_{260} x 1000/1 ml	I.p.m./1 ml	E_{260} x 1000/1 ml	I.p.m./1 ml	E_{260} x 1000	I.p.m.
1	45.000 (10 µ mol)	unmarkiert	3.120	----	7 %	----
2	45.000	unmarkiert	3.410	----	7,6 %	----
3	45.000	1.120.000	1.220	19.800	2,7 %	1,8 %
4	45.000	1.120.000	960	11.000	2,1 %	1 %

Tafel 10 : Unterschied in der Nicotinsäureausbeute bei Verwendung von unmarkiertem und ^{3}H-markiertem 3-Acetylpyridin.

Inzwischen konnte HEIDINGER (30) das Problem klären, weswegen mit unmarkiertem 3-AP mehr Nicotinsäure entsteht als mit Tritiummarkiertem.

Bande (d) :

Diese Bande, die nach zweimaliger Entwicklung des Chromatogramms mit Fm:5 bei Rf x 100 von 48 lief, war schon angedeutet im Leerversuch erschienen. Bei den Versuchen mit $NADH_2$ war sie sehr breit und färbte sich mit dem König-Farbtest orangegelb.

Bei der Rechromatographie mit Fm:4 blieb diese Bande einheitlich. Wir konnten sie auf die oben beschriebene Art als Nicotinsäureamid identifizieren. Bei Versuchen mit Tritiummarkiertem 3-AP fanden wir keine Radioaktivität in dieser Bande.
Bande (d) enthielt also Nicotinsäureamid und ist ein Spaltprodukt der im Ansatz enthaltenen Pyridincofermente.

Bande (e) :

Bande (e) war schon rein optisch im Chromatogramm mit Fm:5 an ihrer typischen Form zu erkennen. Sie setzte sich mit einem scharfen Rand gegen die Nicotinsäureamidbande ab, während ihr unterer Rand weniger scharf wie ausgefranst in Erscheinung trat (Abb.22). Sie lief nach zweimaligem Chromatographieren bei einem Rf x 100 von 40.
Bei Rechromatographie mit Fm:4 spaltete sich Bande (e) in drei Banden auf: (e_1) betrug 8%, (e_2) 82%, (e_3) 10% der Gesamtbande.

Bande (e_2) lief in allen Fliessmitteln auf derselben Höhe wie P-3-Mc und gab das typische von KANIG (36)

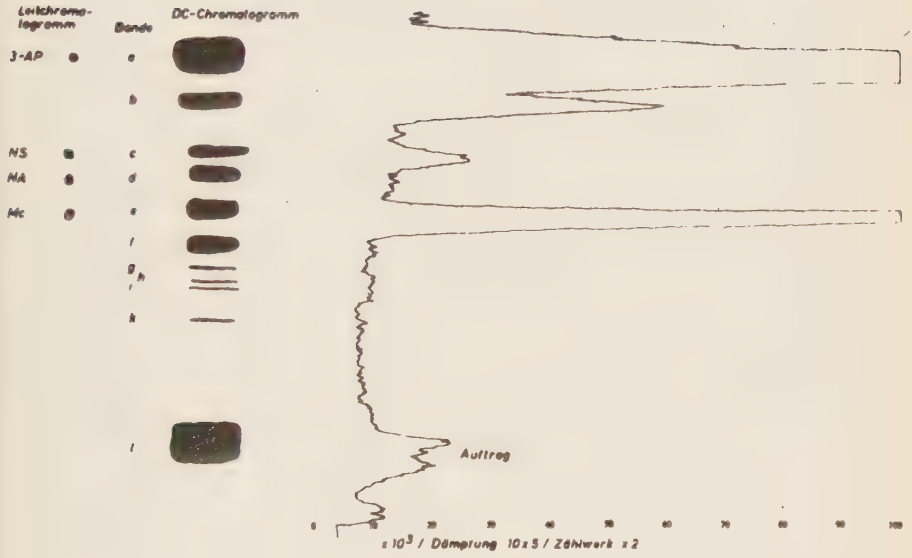


Abb. 25: *Radiogramm eines Ansatzes mit der Leberpräparation: Überstand 10000g unter Zusatz von 3-AP und $NADH_2$*

angegebene UV-Spektrum. Mit dem König-Reagens färbte sich Bande (e) viel langsamer und schwächer als die anderen Banden und gab dann eine rosarote Farbe. Bei Versuchen mit Tritiummarkiertem 3-AP war Bande (e) stark radioaktiv markiert (vgl.Abb.25). Der Mittelwert ihrer spezifischen Aktivität betrug bei 5 Versuchen, in denen Bande (e) nicht rechromatographiert worden war, 60$\pm$ 5% der spezifischen Aktivität des 3-AP. Wurde die Bande jedoch rechromatographiert, so war nur (e_2) markiert, und wir bekamen eine spezifische Aktivität von 75% des 3-AP, da (e_1) und (e_3), die nicht radioaktiv markiert waren, durch die Rechromatographie abgetrennt worden waren.
In Tafel 11 wird die spezifische Aktivität von 3-Acetylpyridin mit der von Pyridin-3-methylcarbinol verglichen. Die Werte wurden auf dieselbe Weise ermittelt wie für Tafel 9 (siehe S. 42).

Versuch	Substanz	Impulse/min pro 1 ml	E_{260} x 1000	$\frac{I.p.m.}{E_{260}}$	$II/_{I}$. 100
1	3-AP	9.125.000	45.330	201 I	56 %
	P-3-Mc	828.000	7.280	113 II	
2	3-AP	8.627.300	44.880	192 I	57 %
	P-3-Mc	694.000	6.300	110 II	
3	3-AP	8.353.000	45.050	180 I	57 %
	P-3-Mc	842.600	8.200	102 II	
4	3-AP	7.315.000	43.900	166 I	52 %
	P-3-Mc	826.400	9.500	86 II	
5	3-AP	8.062.500	45.580	176 I	73 %
	P-3-Mc	1.887.500	14.650	128 II	
					$\bar{x}$ = 60± 3 %
6	3-AP rechromatographiert	764.100	15.400	49 I	75 %
	P-3-Mc rechromatographiert	851.380	22.800	37 II	

Tafel 11: Vergleich der spezifischen Aktivität von 3-Acetyl-pyridin mit der von Pyridin-3-methylcarbinol.

Die rechromatographierte Bande (e) untersuchten wir schliesslich mit der Isotopenverdünnungsmethode:

In 2,5 ml Eluat der Bande (e) wurde eine Extinktion von (E_{260} x 1000 *in* n/10 HCl) 19 825 gemessen. Bei einer spezifischen Extinktion des Pyridin-3-methylcarbinols von $E_{spez.}$ = 4450 waren demnach 4,4 µmol enthalten. Das Eluat wurde alkalisch gemacht (pH 10) und dreimal mit gleichem Volumen Isobutanol ausgeschüttelt, wieder angesäuert und das Isobutanol abdestilliert. Dem Rückstand wurden 11 mg P-3-Mc und o,5 ml Methyljodid hinzugefügt. Dann wurde bei 40°C inkubiert. Die ausgefallenen Salze des N-Methyl-pyridin-3-methylcarbinol-jodids(36) wurden in einigen Tropfen heissem Amylalkohol gelöst. In der Kälte fielen die Kristalle wieder aus. Vom Überstand wurden für die Radioaktivitäts + -und Extinktionsmessung je 0,1 ml abgenommen. Im ganzen wurden auf diese Weise eine erste Kristallisation und fünf Rekristallisationen durchgeführt. Wie Tafel 12 zeigt, bleibt die spezifische Aktivität von der 3. Rekristallisation an konstant.

Durch diese Isotopenverdünnung ist also erwiesen, dass die Substanz der Bande (e) Pyridin-3-methylcarbinol ist.

+ Für die Zählung der Impulse wurde ein automatischer Flüssigkeits-Scintillationszähler "Tricarb", Modell 314 EX, der Fa. PACCARD, USA, benutzt.

	Impulse/min pro 0,1 ml	E_{260} x 1000 pro 0,1 ml	I.p.m./E_{260}
1. Kristallisation	119.194	42.426	2,8
1. Rekristallisation	85.371	11.326	7,6
2. "	52.522	5.500	9,5
3. "	41.527	3.600	11,5
4. "	77.670	6.930	11,2
5. "	34.872	3.136	11,1

Tafel 12 : Isotopenverdünnung durch Umkristallisation von Pyridin-3-methylcarbinol unter Zusatz der ^{3}H-markierten Substanz aus Bande (e). Jeweils 0,1 ml der in Amylalkohol gelösten Kristalle des N-methylierten P-3-Mc wurden zur Impulszählung und zur Extinktionsmessung bei λ 260 nm (n/10 HCl) verwandt.

Bande (f) :

Bande (f) ist ein Spaltprodukt der Pyridin-Cofermente.

Wird dem Ansatz nur 3-AP und kein Coferment zugegeben, so entsteht diese Bande nicht (vgl. Abb.22). Die Bande hatte mit Fm:5 einen Rf x 100 von 30 und lief mit keiner Testsubstanz zusammen. Sie war König-negativ. In Kapitel (4a) S.25 wird die Chromatographie unserer Ansätze mit dem Nucleotid-Fliessmittel 9 beschrieben. Wird Bande I (vgl. Abb.17) dieser Chromatogramme mit Fm:5 rechromatographiert, so erhalten wir ausser 3-Acetylpyridin und Nicotinsäureamid auch Bande (f). Bande (f) verändert sich geringfügig bei der Chromatographie mit Fm:5, wie wir mit der TRT-Technik nachweisen konnten (siehe S.24 und Abb.16). Bei der Rechromatographie mit Fm:4 lässt sich eine kleinere Bande (f_1) abtrennen. Das UV-Spektrum der Hauptbande ist in Abb.26 wiedergegeben. In n/10 HCl liegt das Maximum bei 246 mμ, das Minimum bei 220 mμ; in n/10 NaOH befindet sich das Maximum bei 260 mμ, das Minimum bei 233 mμ. Dieses Spektrum unterscheidet sich von dem des Nicotinsäuremononucleotids (NMN), wofür wir Bande (f) zunächst hielten. Darüberhinaus bleibt NMN im Gegensatz zur Bande (f) bei der DC mit Fm:5 am Start liegen. Der Test auf im Nucleosid nicht substituierte Ribose, wie er S.28 beschrieben ist, fällt für Bande (f) negativ aus.

Bande (1) :

Die Nucleotide blieben bei der Chromatographie mit Fm:5 am Start liegen. Wir rechromatographierten diese Bande, die wir mit (1) bezeichneten, mit Fliessmittel 9 (siehe S. 26) und konnten sie in fünf Banden (1_1) bis (1_5) auftrennen.

Chromatographie mit Fm. 5	Rfx100	Rechromatographie mit Fm.: 4	Rfx100	KÖNIG-Farbtest	% der UV-Extinktion der Gesamtbande	Radioaktivität	läuft in allen 5 Fliessmitteln auf Höhe von:	UV-Spektrum identisch mit.	Identifiziert als
a	80	a_1	69		10%	0			
		a_2	58	+	90%	+	3-AP	3-AP	3-AP
b	70	b_1	64		50%	0			
		b_2	39	+	50%	+	3-A-6-Pyridon	3-A-6-Pyridon	3-A-6-Pyridon
c	60	c_1	63		25%	0			
		c_2	42		10%	?			
		c_3	27	+	65%	?	NS	NS	NS
d	48	d	50	+	100%	0?	NA	NA	NA
e	40	e_1	67		8%	0			
		e_2	58	+	82%	+	P-3-Mc	P-3-Mc	P-3-Mc
		e_3	30		10%	0			
f	30	f_1	63		20%				
		f_2	17	0	80%	0?	?	?	?
l	0	l_1	Fm. 9	0		0			
		l_2	Fm. 9	0		0			
		l_3	Fm. 9	0		0			
		l_4	Fm. 9	+		+			
		l_5	Fm. 9	0		0			

Tafel 13: Qualitative Auswertung der DC-Chromatogramme

Von diesen Banden war eine, und zwar (1_4), König-positiv (vgl.Abb.22). Diese Bande enthielt in Versuchen mit Tritiummarkiertem 3-AP die gesamte Radioaktivität, die wir in der Auftrag-Bande nachweisen konnten. (1_4) lief nicht auf der Höhe von 3-APAD, NAD oder P-3-Mc AD. Wir bekamen kein sauberes Spektrum von Bande (1_4), da sie offensichtlich noch mehrere Substanzen enthielt.

Die Banden (g) bis (k), die sich mit Fm:5 noch unter Bande (f) abtrennten, waren winzige strichförmige Banden, die wir nicht näher untersuchten. Tafel 13 gibt eine Übersicht über die hier mitgeteilten Ergebnisse, die wie folgt nochmals kurz zusammengefasst sind:

Wird 3-AP mit einer Leberzellpräparation ohne weiteren Zusatz inkubiert, so erhalten wir nur einen Metaboliten, das 3-Acetyl-6-Pyridon. Wird diesem Ansatz noch $NADH_2$ zugefügt, so entsteht noch ein Metabolit, das Pyridin-3-methylcarbinol.

Zusätzlich entstehen Spaltprodukte des NAD und zwar das Nicotinsäureamid und eine Bande (f), die wir nicht identifizieren konnten.

Die Herkunft der ebenfalls auftretenden geringen Menge von Nicotinsäure konnten wir nicht klären.

In der Auftragbande (1) war noch eine radioaktive Substanz enthalten, die allein auf (1_4), die König-Positive der fünf in (1) enthaltenen Banden, entfiel.

In Abbildung 23 und 26 sind die UV-Absorptionskurven der verschiedenen von uns isolierten Pyridinbasen dargestellt. Die Abbildungen 24 und 25 erlauben einen Vergleich zwischen Versuchen mit und ohne hydrierendem Coferment. In Abbildung 24 imponiert 3-Acetyl-6-pyridon

als Hauptmetabolit des 3-AP, während in Abbildung 25, die das Radiogramm eines Ansatzes mit $NADH_2$ zeigt, P-3-Mc das Stoffwechselprodukt mit der grössten Radioaktivität ist. Tafel 13 gibt einen Überblick über unsere qualitativen Ergebnisse.

b) Versuche mit $NADPH_2$

Nachdem wir gelernt hatten, die Dünnschicht-Chromatogramme qualitativ zu differenzieren, beschäftigten wir uns mit der Frage, unter welchen Bedingungen P-3-Mc gebildet wird.
Wir hatten bereits gesehen, dass mit $NADH_2$ die Hydrierung gesteigert wird. Unsere nächsten Versuche sollten klären, ob noch weitere wasserstoffübertragende Cofermente diese Hydrierung fördern. Es lag nahe, das Verhalten von $NADPH_2$ zu untersuchen.

Wir inkubierten dieses unter denselben Bedingungen wie in den oben beschriebenen Versuchen und erhielten bei der Chromatographie mit Fm:5 wiederum 6 Banden und Bande (1) am Start.

Dennoch waren zwischen beiden Chromatogrammen deutliche Unterschiede zu erkennen, und zwar in der Breite der Banden (vgl.Abb.22) :

Im Chromatogramm des $NADPH_2$-Versuches war

1. Bande (d) = Nicotinsäureamid erheblich schmäler
2. Bande (e) = Pyridin-3-Methylcarbinol breiter
3. Bande (f) nur ganz schmal

Es waren also einerseits weniger Spaltprodukte des Coferments entstanden, andererseits aber mehr P-3-Mc.

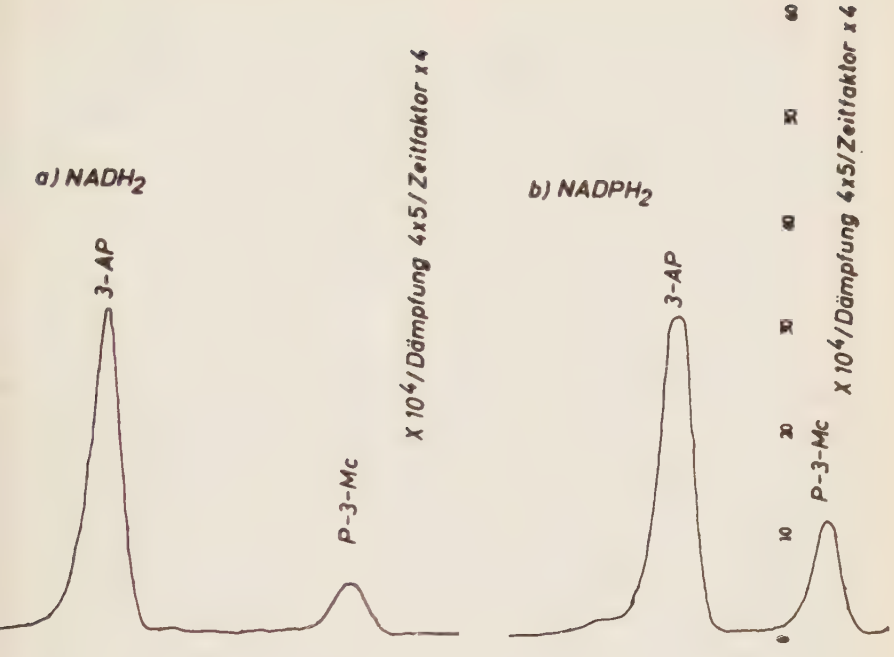


Abb. 27: Radiogramme von zwei Ansätzen mit der Leberpräparation: Überstand 10000 g unter Zusatz von 3-AP und a) $NADH_2$ b) $NADPH_2$

Der zuletzt genannte Befund wurde dadurch bestätigt, dass wir Radiogramme von NADP-Versuchen mit solchen von NAD verglichen. Bei Versuchen mit NADP war die Radioaktivität der P-3-Mc-Bande grösser (vgl.Abb.27).

II. Quantitative Auswertung

Zunächst orientierten wir uns über die Leistungsfähigkeit unserer Methode für die quantitative Auswertung. Wir hatten bei der Denaturierung der Ansätze, beim Auftragen, Auskratzen und Eluieren der Chromatogramme mit Substanzverlusten zu rechnen.
Die Ausbeute schwankte daher erheblich und zwar zwischen $\bar{x}$ = 81 + 9% bei n = 120 Versuchen.
Quantitative Aussagen waren durch diese hohe methodische Schwankungsbreite sehr in Frage gestellt, was umsomehr für kleinere Versuchsreihen etwa mit n = 10 Versuchen galt (siehe Tafel 14 und 15). Wir konnten jedoch feststellen, dass meist alle aus dem Dünnschicht-Chromatogramm eluierten Banden von den Schwankungen unserer Werte gleichsinnig betroffen waren (vgl. in Tafel 14 Versuch A,1 und A,2). Diese gleichsinnigen Schwankungen sind zurückzuführen auf:

1) dem unterschiedlichen Eiweissgehalt unserer Ansätze. (Es war unvermeidlich, dass trotz konstanter Ausgangsbedingungen der Eiweissgehalt unserer Leberzellpräparationen schwankte. Von einer grösseren Eiweissmenge wird z.B. beim Denaturieren auch eine grössere Menge von Pyridinbasen eingeschlossen. Aus einem Ansatz von 1 ml waren nach dem Denaturieren nur noch 0,7 ml zu gewinnen; 0,3 ml waren durch das Abzentrifugieren des Eiweisses verloren gegangen.)

2) Auftragefehler (Es stand uns zum Auftragen unserer Ansätze nur eine halbe DC-Plattenbreite zur Verfügung, da die andere Hälfte für die Tests frei blieb - vgl.Abb.13. Wir konnten also nur sehr kleine Mengen, etwa 0,1 - 0,2 ml, auftragen. Ein Auftragefehler von nur 0,01 ml würde also bereits die Ausbeute um 5 - 10% erniedrigen. oder erhöhen.

3) Verluste beim Chromatographieren, Auskratzen und Eluieren.

Diese methodischen Schwankungen kommen dann voll zur Geltung und verfälschen die Ergebnisse, wenn man die Werte der chromatographierten Basen in Beziehung zum eingesetzten 3-AP setzt. Unverfälschte Ergebnisse aber erhält man, wenn man die Werte der einzelnen aus dem Chromatogramm eluierten Basen direkt miteinander vergleicht. Durch gleichsinnige methodische Schwankungen wird nämlich das Verhältnis der einzelnen Basen zueinander nicht beeinflusst. Solche Verhältniszahlen machen eine quantitative Auswertung von Dünnschicht-Chromatogrammen und den Vergleich verschiedener Versuchsreihen möglich(vgl.Tafel 14 und 15).

Unsere qualitativen Untersuchungen wurden im vorigen Kapitel beschrieben. Daraus geht hervor, dass es uns mit der DC gelingt, aus unseren Ansätzen nicht verändertes 3-AP und seine beiden Metaboliten P-3-Mc und 3-Acetyl-6-pyridon (3-A-6-pyr.) zu bestimmen. Die gleichfalls nachgewiesene Nicotinsäure betrachten wir auch als Metaboliten des 3-AP, obwohl wir diese Annahme nicht einwandfrei sichern konnten.

Die Summe der UV-Extinktion dieser vier Substanzen: 3-AP (Bande a), 3-A-6-pyr. (Bande b), NS (Bande c) und P-3-Mc (Bande e) = $\Sigma E_{260}^{a,b,c,e}$ wählen wir deshalb zu unserer Bezugsgrösse und haben dadurch den grossen

Vorteil, von gleichsinnigen methodischen Fehlern unabhängig zu sein.

Die Extinktion der einzelnen Bande wird dann in Prozent dieser Summe angegeben. Dies ist zulässig, weil sich die spezifischen Extinktionen von 3-AP, P-3-Mc und NS kaum unterscheiden. Von 3-A-6-pyr. kennen wir die spezifische Extinktion nicht. Sollte sie jedoch stärker abweichen, so fiele das wenig ins Gewicht, da auf 3-A-6-pyr nur rund 5% der Gesamtsumme entfallen.

Vergleichen wir unsere Bezugsgrösse $\sum E_{260}$a,b,c,e mit der Extinktion des in den Versuch eingesetzten 3-AP (μ mol/ml x spez.Extinktion), so erhalten wir eine Aussage über Ausbeute und methodische Fehler unserer Versuche.
In Tafel 14 und 15 ist die $\sum E_{260}$a,b,c,e in Prozent des eingesetzten 3-AP angegeben ("% der Ausbeute").
In unseren Tafeln sind die Werte als Extinktion angegeben und zwar umgerechnet auf 1 ml enteiweissten Ansatz. - Eine Angabe der Werte in μ mol hielten wir für nicht vertretbar, da keine der angegebenen Substanzen völlig rein war, wie Tafel 13 zeigt. Sollte es in weiteren Untersuchungen gelingen, die in den Banden noch enthaltenen Substanzen zu identifizieren, so könnten unsere Extinktionsangaben in μ mol umgerechnet werden.

Mit vier Versuchsreihen soll demonstriert werden, wie es gelungen ist, durch Veränderung der Versuchsbedingungen die P-3-Mc-Entstehung zu steigern. Ausserdem wird gezeigt, dass mit dem Coferment $NADPH_2$ mehr P-3-Mc entsteht als mit $NADH_2$.
In 1 ml Ansatz befanden sich im Durchschnitt 50 mg Eiweiss, das wir mit der Biuretmethode bestimmten. Ein Einfluss der Eiweisskonzentration auf die 3-AP-Umsetzung war nicht festzustellen (siehe Tafel 14).

Versuch Nr.	Eiweissgehalt mg/ml Ansatz	E_{260} in 1 ml des enteiweissten Ansatzes nach Trennung mit der DC (n/10HCl) 3-AP (a)	P-3-Mc (c)	NS (c)	3-A-6-pyr (b)	$\sum E_{260}$ a,b,e	% der $\sum E_{260}$ a,b,c,e P-3-Mc	NS	3-A-6-pyr	E_{260} NA/ µ mol inkubiertes Coferment	% der Ausbeute
A,1	27,8	48,157	8,598	4,328	nicht bestimmt	61,138	14,1	7,2	---	383	82
A,2	27,8	28,585	5,345	1,620	"	35,771	15,0	4,5	---	298	48
A,3	27,8	36,205	8,450	1,921	"	46,677	18,1	4,3	---	230	62
A,4	42,2	44,800	7,000	1,920	"	53,720	15,6	4,3	---	333	72
A,5	42,2	41,300	10,920	2,730	"	54,940	19,9	4,9	---	756	74
A,6	42,2	45,450	10,770	4,360	"	60,580	17,8	7,2	---	504	81
A,7	42,2	45,840	12,500	2,380	"	60,720	20,6	3,9	---	1,100	81
A,8	42,2	45,508	14,650	nicht bestimmt	2,100	62,330	23,5	---	3,3	694	83
A,9	42,2	45,050	8,200	"	2,360	55,610	14,5	---	4,1	890	74
A,10	42,2	43,900	9,500	"	2,230	55,630	17,1	---	4,0	903	74
						$\bar{x} = 17,8 \pm 2,4$					
B,1	42,2	47,600	7,700	2,740	nicht bestimmt	58,040	13,3	4,7	---	920	78
B,2	42,2	42,000	3,580	3,720	"	49,300	7,5	7,5	---	1,640	66
B,3	64	37,100	5,740	1,760	"	44,600	12,9	3,9	---	1,280	60
B,4	64	41,160	4,340	2,450	"	47,950	9,1	5,1	---	1,500	64
B,5	64	47,612	4,325	2,338	2,021	56,329	7,7	4,1	3,6	1,532	75
B,6	64	45,156	3,750	2,625	1,875	53,406	7,0	4,9	3,5	460	71
B,7	51	39,900	4,800	3,490	nicht bestimmt	48,190	12,0	8,9	---	680	64
B,8	51	41,830	3,150	3,280	"	48,260	7,5	7,8	---	1,310	64
B,9	51	41,230	7,470	4,430	"	53,130	14,1	8,3	---	1,290	71
B,10	51	44,880	6,300	nicht bestimmt	"	51,180	12,3	---	---	755	68
						$\bar{x} = 10,3 \pm 3,9$					

Tafel 14: Quantitative Auswertung von Versuchen mit einer Leberpräparation (Überstand 2000 g), 3-AP (16,6 µmol/ml Ansatz) und Pyridincofermenten : Versuch A,1 - A,10 mit $NADPH_2$ (10,2 µmol/ml) und B,1 - B,10 mit $NADH_2$ (10,2 µmol/ml).

Weitere Einzelheiten im Text.

Die Versuche wurden mit der Leberpräparation Überstand 2000 g (siehe S.33), in der noch Mitochondrien enthalten waren, durchgeführt.
Den Ansätzen der ersten Versuchsreihe war 3-AP und hydrierendes Coferment nicht in stöchiometrischen Verhältnis zugeführt worden. Wir arbeiteten vielmehr mit 3-AP im Überschuss in der Hoffnung, so die Ausbeute an Metaboliten zu erhöhen. Die Ansätze enthielten 16,6 μ mol 3-AP und 10,2 μ mol $NADPH_2$ bzw. $NADH_2$ und wurden 60 min bei 40°C inkubiert.

Bei 10 Versuchen erhielten wir in Ansätzen mit
$NADPH_2$ $\bar{x}$ = 17,8 + 2,4% P-3-Mc und in Ansätzen mit
$NADH_2$ $\bar{x}$ = 10,3 + 3,9% P-3-Mc (siehe Tafel 14 und 16).
Die Differenz war signifikant ($t = 5{,}244$; $p < 0{,}0005$)

In der zweiten Versuchsreihe wurde 3-AP und hydrierendes Coferment den Ansätzen in stöchiometrischem Verhältnis zugefügt. Die Konzentration des 3-AP pro ml Ansatz war im Vergleich zur ersten Versuchsreihe vermindert worden. Inkubiert wurde 60 min bei 40°C.

Die Ansätze enzhielten 10,2 μmol 3-AP und 10,2 μ mol $NADPH_2$ bzw. $NADH_2$.

Aus je 10 Versuchen erhielten wir in Ansätzen mit
$NADPH_2$ $\bar{x}$ = 25 + 4,6% P-3-Mc, in Ansätzen mit
$NADH_2$ $\bar{x}$ = 15,9 + 1,53% P-3-Mc (siehe Tafel 16).
Die Differenz war wiederum si nifikant: $t = 5{,}69$; $p < 0{,}0005$

Die Ausbeute von P-3-Mc war entsprechend der relativ höheren Cofermentmenge grösser. Aus diesem Grunde fügten wir zur Reduktion des entstehenden NADP bei unserer dritten Versuchsreihe den Ansätzen Glucose-6-phosphat zu. Dieses wird zu Gluconsäure-6-phosphat oxydiert. Der dabei frei werdende Wasserstoff geht nach der Formel:

Glucose-6-Ph + $NADP^+ \longrightarrow$ Gluconsäure-6-ph + $NADPH_2$.

auf NADP über.

Versuch Nr.	E_{260} in 1 ml des enteiweissten Ansatzes (n/10 HCl) nach Trennung mit der DC				ΣE_{260} a,b,c,e	% der ΣE_{260} a,b,c,e			E_{260} nM/ µmol inkubiertes Coferment	% der Ausbeute
	3-AP (a)	P-3-Mc (c)	NS (e)	3-A-6-pyr (b)		P-3-Mc	NS	3-A-6-pyr		
E,1	20.323	13.583	2.052	1.599	37.558	36,2	5,4	4,3	579	83
E,2	16.040	10.057	1.625	1.210	28.932	34.8	5,6	4,2	418	64
E,3	24.400	14.725	1.850	2.320	43.290	34	4,2	5,3	883	96
E,4	17.440	12.000	1.690	1.020	32.150	37	5,2	3,2	762	71
E,5	18.980	12.170	1.940	1.155	34.255	35	5,6	3,3	862	76
E,6	21.234	11.182	1.508	1.917	35.840	31	4,2	5,3	822	79
E,7	20.625	7.723	1.265	2.098	31.713	24	3,9	6,6	1.226	70
E,8	19.781	11.245	2.473	1.675	35.130	32	7,0	4,6	828	78
E,9	23.284	8.208	3.448	1.088	36.027	22,7	9,5	3,0	988	80
E,10	24.396	8.833	2.221	1.158	36.607	24	4,8	3,1	1.030	81
					$\bar{x}$ = 31 ± 5,6%					
F,1	28.519	2.596	1.403	1.211	33.730	7,7	4,1	3,6	1.532	75
F,2	26.384	4.230	2.326	-----	32.942	12,8	7,1	---	812	73
F,3	32.089	6.017	1.428	1.357	40.892	14,7	3,4	3,3	1.256	91
F,4	29.910	7.589	1.517	1.821	40.837	18,5	3,7	4,4	1.644	90
F,5	30.442	3.480	1.017	1.178	33.696	9,5	3,0	3,5	-----	75
F,6	25.961	3.769	1.907	-----	31.637	12,0	6,0	---	2.500	70
F,7	24.482	3.434	1.655	690	30.262	11,3	5,5	2,3	2.213	67
F,8	31.750	3.770	2.019	2.269	39.808	9,5	5,1	5,7	713	88
F,9	29.750	5.333	1.500	-----	36.583	14,6	4,1	---	1.110	81
F,10	29.530	4.976	1.946	-----	36.452	13,7	5,3	---	1.550	81
					$\bar{x}$ = 12,7 ± 2,1%					

Tafel 15: Quantitative Auswertung von Versuchen einer Leberpräparation (Überstand 2000 g), 3-AP (10,2 µmol), Glucose-6-phosphat (14,2 µmol), und Pyridincofermente: Versuch E,1 - E,10 mit $NADPH_2$ (10,2 µmol) und F,1 - F,10 mit $NADH_2$ (10,2 µmol/ml). Weitere Einzelheiten im Text.

Bei 10 Versuchen mit $NADPH_2$ und Glucose-6-phosphat - die übrigen Bedingungen waren die gleichen wie bei der zweiten Versuchsreihe - erzielten wir so eine weitere Steigerung der P-3-Mc-Ausbeute: $\bar{x} = 31,0 \pm 5,6\%$ (s.Taf.15 Bei 10 Versuchen mit $NADH_2$ und Glucose-6-phosphat steigerte sich, wie zu erwarten, die P-3-Mc-Ausbeute nicht: $\bar{x} = 12,7 \pm 2,4\%$ s.Taf.15).

Für die Differenz ergab sich diesmal $t = 9,37$ $p \leq 0,0005$ (siehe Tafel 16).

Bei unserer vierten Versuchsreihe war die Cofermentkonzentration gegenüber der 3-AP-Konzentration relativ höher. Die Inkubationszeit wurde ebenfalls verlängert und zwar auf 140 min.

Mit dem Ansatz	Leberpräparation Überstand 2000 g	1,5 ml
	Sörensen-Phosphatpuffer enthaltend 50 µ mol Glucose-6-ph, 40 µ mol Coferment und 30 µ mol 3-AP	2,0 ml
	pH 7,4	3,5 ml

also enthaltend 8,5 µ mol 3-AP, 11,4 µ mol Coferment und 14,2 µ mol Glucose-6-ph pro ml Ansatz, erzielten wir eine P-3-Mc-Ausbeute von 75% mit $NADPH_2$ und 43% mit $NADH_2$.

(Siehe Abb.28).

In Tafel 16 sind die hier angegebenen Ergebnisse zusammengefasst. Die vier Versuchsgruppen zeigten, dass die Hydrierung des 3-AP sowohl mit $NADH_2$ als auch mit $NADPH_2$ gelingt, und dass eine signifikant höhere Ausbeute an P-3-Mc zu erzielen ist, wenn $NADPH_2$ Coferment ist. Wird dem Ansatz noch Glucose-6-phosphat zugefügt, so steigt die P-3-Mc-Ausbeute weiter an, wenn $NADPH_2$ Coferment ist. Unter optimalen Bedingungen konnten 75% des 3-AP zu P-3-Mc hydriert werden.

Anzahl der Versuche		eingesetztes 3-AP in µmol/ml Ansatz	eingesetztes Coferment in µmol/ml Ansatz	eingesetztes Glucose-6-phos µmol/ml Ansatz	Inkubations-Zeit	entstandenes P-3-Mc in % des einges. 3-AP als Mittelwert $\bar{x}$	Varianz σ^2	$\frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{\sigma\bar{x}_1^2 + \sigma\bar{x}_2^2}} = t$
I	10	16,6 µmol 3-AP	10,2 µmol $NADPH_2$	———	40 min.	17,8 %	5,78	5,24
II	10	16,6 µmol 3-AP	10,2 µmol $NADH_2$	———	40 min	10,3 %	14,6	
III	10	10,2 µmol 3-AP	10,2 µmol $NADPH_2$	———	80 min.	25,0 %	21,6	5,69
IV	10	10,2 µmol 3-AP	10,2 µmol $NADH_2$	———	80 min	15,9 %	2,33	
V	10	10,2 µmol 3-AP	10,2 µmol $NADPH_2$	13,4 µmol G-6-ph	60 min	31,0 %	31,3	9,73
VI	10	10,2 µmol 3-AP	10,2 µmol $NADH_2$	13,4 µmol G-6-ph	60 min.	12,7 %	4,22	
VII	2	8,5 µmol 3-AP	11,4 µmol $NADPH_2$	14,2 µmol G-6-ph	140 min	75,0 %	———	———
VIII	2	8,5 µmol 3-AP	11,4 µmol $NADH_2$	14,2 µmol G-6-ph	140 min	43,0 %	———	———

Tafel 16: P-3-Mc Ausbeute bei Versuchen mit $NADPH_2$ und mit $NADH_2$ als Coferment.
Die Formeln sind aus „DOCUMENTA GEIGY"-Wissenschaftliche Tabellen entnommen

$$\sigma = \pm\sqrt{\frac{\sum x^2 - (\bar{x}\cdot\sum x)}{n-1}} \quad ; \quad \sigma_{\bar{x}} = \frac{\sigma}{\sqrt{n}} \quad ; \quad t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{\sigma\bar{x}_1^2 + \sigma\bar{x}_2^2}}$$

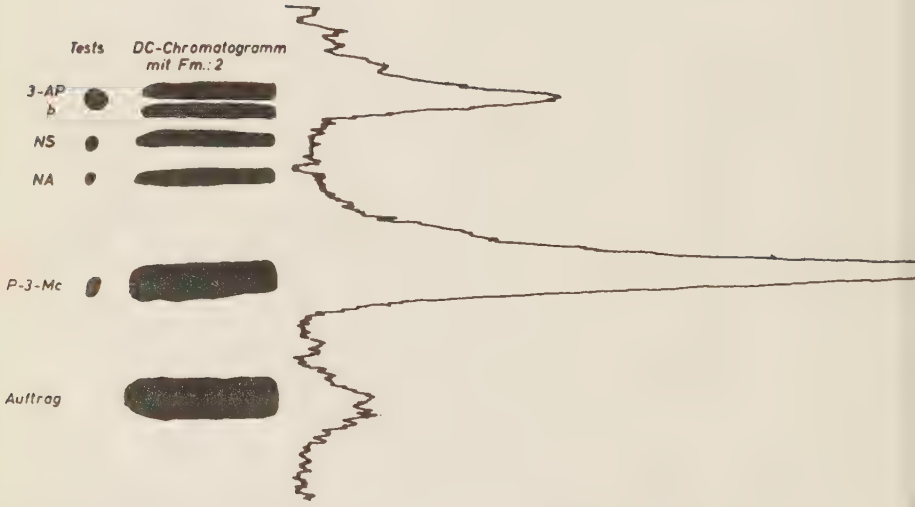


Abb. 28: Radiogramm, das die Entstehung von 75% P-3-Mc in einem Ansatz mit 3-AP + $NADPH_2$ + G-6-ph zeigt. $x10^3$/Dämpfung 10x5/Zählwerk

Wir werteten gleichzeitig auch die anderen Banden quantitativ aus. Ausser den in Tafel 14 und 15 angegebenen Werten standen uns noch Ergebnisse weiterer Versuchsreihen zur Verfügung.

Bande (d) enthält das vom Coferment abgespaltene Nicotinsäureamid (NA). Vom NAD wurde bei unseren in vitro-Versuchen fast doppelt so viel Nicotinsäureamid abgespalten als vom NADP.

Wir geben die UV-Extinktion (E_{260} mμ in n/10 HCl) des NA pro μ mol des eingesetzten Cofermentes an. Bei je 20 Versuchen erhielten wir

E_{260} = 662 $\pm$ 91 pro μ mol eingesetztes NADP und
E_{260} = 1750 $\pm$ 474 pro μ mol eingesetztes NAD.

Die Differenz war signifikant: $t = 9{,}6$; $p < 0{,}0005$
Von einem μ mol NADP waren in 60 min also 0,15 μ mol NA, von einem μ mol NAD 0,39 μ mol NA abgespalten worden.

Bei Bande (b), die zum grösseren Teil aus 3-Acetyl-6-pyridon besteht, wurde bei allen Versuchen unabhängig von der Dauer der Inkubationszeit oder der Menge des vorgelegten 3-AP eine relativ kleine Ausbeute erzielt. Aus 64 Versuchen ergab sich $\bar{x} = 4{,}9 \pm 2{,}7\%$ der Summe $\sum E_{260}$ (a), (b), (c), (e).

Auch Bande (c), deren Hauptanteil Nicotinsäure ist, hatte trotz Veränderung der Ausgangswerte der Ansätze eine ziemlich konstante UV-Extinktion. Aus 94 Versuchen ergab sich $\bar{x} = 5{,}7 \pm 1{,}7\%$.

Die Ausbeute war also für 3-Acetyl-6-pyridon und Nicotinsäure, unbeeinflusst von den verschiedenen Ausgangswerten der einzelnen Versuchsgruppen, relativ niedrig und betrug 4,9 % bzw. 5,7%. Bei diesen Angaben sind die geringen Beimengungen anderer Substanzen, die diese beiden Banden noch enthielten, miterfasst, da wir bei den Versuchen für die quantitative Auswertung nicht rechromatographierten.

III : Einfluss der 3-Acetylpyridin-Konzentration und der Inkubationszeit auf die Pyridin-3-methylcarbinol-Entstehung.

In orientierenden Versuchen wurde geprüft, ob die Reaktionen

$$3\text{-AP} + NADPH_2 \longrightarrow P\text{-}3\text{-Mc} + NADP \quad \text{und}$$

$$3\text{-AP} + NADH_2 \longrightarrow P\text{-}3\text{-Mc} + NAD \quad \text{auch}$$

umkehrbar sind.

Der 3-AP-Hydrogenase aus Lebergewebe wurde deshalb P-3-Mc als Substrat und NAD bzw. NADP als Coferment angeboten. Unter den Bedingungen unserer in-vitro-Versuche konnte jedoch keine Oxydation des P-3-Mc zu 3-AP beobachtet werden. Wir können daher annehmen, dass die Reaktion in unseren Versuchen nur in Richtung der Hydrierung ablief und dass eine Reaktion erster Ordnung vorliegt.
Es schien uns daher möglich, mit unserer Methode die Kinetik der 3-AP-Hydrogenase zu untersuchen. Der prozentuale Anteil an entstandenem P-3-Mc fällt bei Versuchen mit $NADPH_2$ steiler ab als bei Versuchen mit $NADH_2$, wenn die Anfangskonzentration des 3-AP im Ansatz gesteigert wird. In Abbildung 29 sind die Sättigungskurven von drei Versuchsreihen dargestellt. In Versuchsreihe (A) wurden 3-AP und $NADH_2$ gleichzeitig äquimolar erhöht, in Versuchsreihe (B) 3-AP und $NADPH_2$, während in Reihe (C) zwar 3-AP erhöht wurde, $NADPH_2$ jedoch einen konstanten Wert von 7 μ mol innehatte und dem Ansatz Glucose-6-phosphat im Überschuss zugefügt worden war. Die drei Versuchsreihen wurden bei 40°C 60 Minuten lang inkubiert.

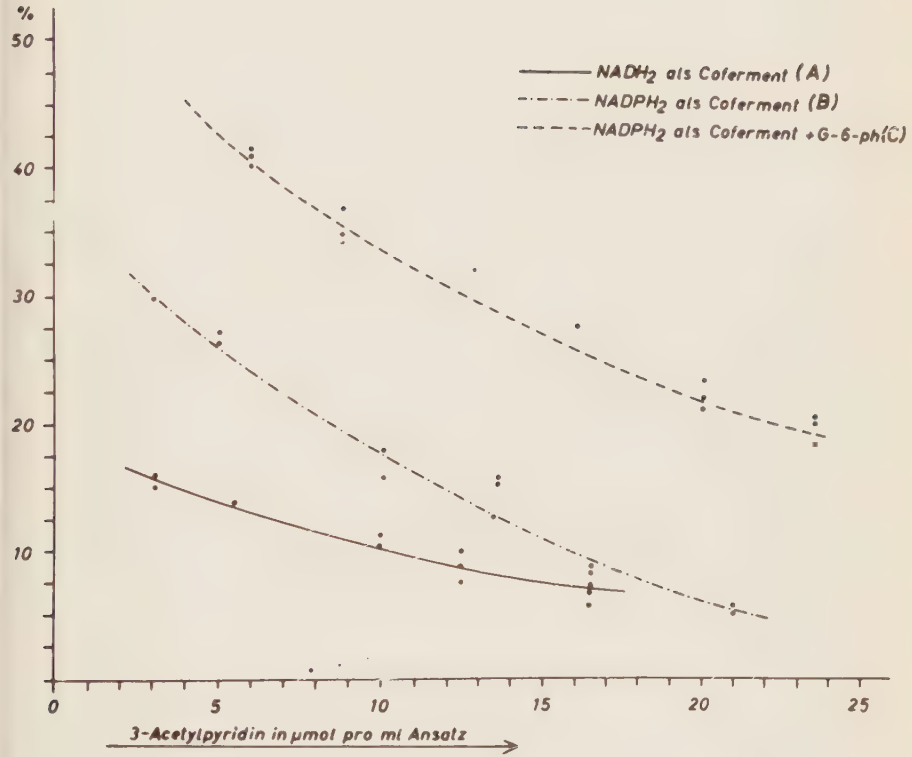


Abb. 29 Pyridin-3-Methylcarbinol-Ausbeute bei zunehmender Konzentration von 3-Acetylpyridin im Ansatz

Der prozentuale Abfall der P-3-Mc-Werte ist für eine enzymatische Reaktion durchaus typisch, denn die Steigerung der Umsatzgeschwindigkeit eines Enzyms wird mit höherer Substratkonzentration geringer und nähert sich schliesslich Null. Die Umsetzung hat dann unter den entsprechenden Versuchsbedingungen die maximale Geschwindigkeit (in unseren Versuchen $V_{(A),(B) \text{ und } (C)}$) erreicht. Die absoluten Werte des entstandenen P-3-Mc müssten sich also trotz steigender 3-AP-Anfangskonzentration einem Grenzwert nähern.
Dies ist jedoch bei den Versuchen der Reihe (A) und (B) nicht der Fall (Tafel 17a). Die P-3-Mc-Werte erreichen einen maximalen Wert bei 14 μmol 3-AP im Ansatz und fallen bei höheren Konzentrationen wieder ab. Die Versuchsreihe (C), bei der ein konstantes Wasserstoffdonatorsystem mit einer relativ niedrigen Cofermentkonzentration vorgegeben ist, steigen die absoluten P-3-Mc-Werte weiter an (Tafel 17b).

Wir verwandten die Werte der Versuchsreihe (A), (B) und (C) zur Anfertigung eines Lineweaver-Burk-Diagramms (vgl.Abb. 30). Die Werte waren auf eine 100%ige Ausbeute umgerechnet.
Die Geraden (A) und (B), die durch Extrapolieren der entsprechenden Kurven entstanden sind, schneiden sich auf der Ordinate 1/S = 0 in Höhe von $V_{(A),(B)} = 7{,}4 \times 10^{-5}$ mol/ml x min, während $V_{(C)} = 11 \times 10^{-5}$ mol/ml x min ist. Für die Michaelis-Konstanten ergab sich:

$$K_{m(NADH_2)} \approx 2{,}6 \times 10^{-5} \text{mol}$$

$$K_{m(NADPH_2)} \approx 1{,}2 \times 10^{-5} \text{mol}$$

$$K_{m(NADPH_2+G\text{-}6\text{-}ph)} \approx 1{,}2 \times 10^{-5} \text{mol}$$

Versuchsreihe A

Dem Ansatz zugefügt µ mol/ml 3-AP	$NADPH_2$	$NADH_2$	Mit der DC isoliertes P-3-Mc E_{260}/ml = µ mol/ml	% des inkubierten 3-AP	E_{260} NA / µ mol Coferment
3	—	3	2010=0,45	15	2386
6	—	6	3869=0,9	15	1270
10	—	10	5140=1,14	11,4	653
14	—	14	5935=1,31	9,3	573
17	—	17	5357=1,2	7,0	460

Versuchsreihe B

3	3	—	4490=1,0	30	660
6	6	—	6860=1,5	25	522
10	10	—	8030=1,8	18	405
14	14	—	8738=1,9	14	273
17	17	—	6262=1,4	8	214
20	20	—	5512=1,2	6	148

Tafel 17a: Pyridin-3-methylcarbinol-Entstehung bei äquimolar steigender 3-Acetylpyridin- und Coferment-Anfangskonzentration (Mittelwerte von zwei Versuchen, vgl. Abb. 29 und 30). Darüberhinaus wurde die Nicotinsäureamid-Abspaltung (E_{260} NA) pro µ mol Coferment angegeben. Die Werte sind auf 100%ige Ausbeute umgerechnet.

Versuchsreihe C

Dem Ansatz zugefügt µmol/ml			Mit der DC isoliertes P-3-Mc	% des inkubierten 3-AP	E_{260} NA / µmol Cofermen
3-AP	$NADPH_2$	G-6-ph			
6	7	15	11124±2,5	41	792
9	7	15	14128±3,1	34	812
12	7	15	15375±3,4	28	822
16	7	15	20506±4,5	28	828
20	7	15	20637±4,6	23	984
24	7	15	21427±4,8	20	945

Tafel 17b: Pyridin-3-methylcarbinol-Entstehung bei steigender 3-Acetylpyridin-Anfangskonzentration und einem konstanten Wasserstoffdonator-System mit $NADPH_2$ und Glucose-6-phosphat.
(Mittelwerte von drei Versuchen, vgl. Abb. 29 und 30).
Die Werte sind auf 100%ige Ausbeute umgerechnet.

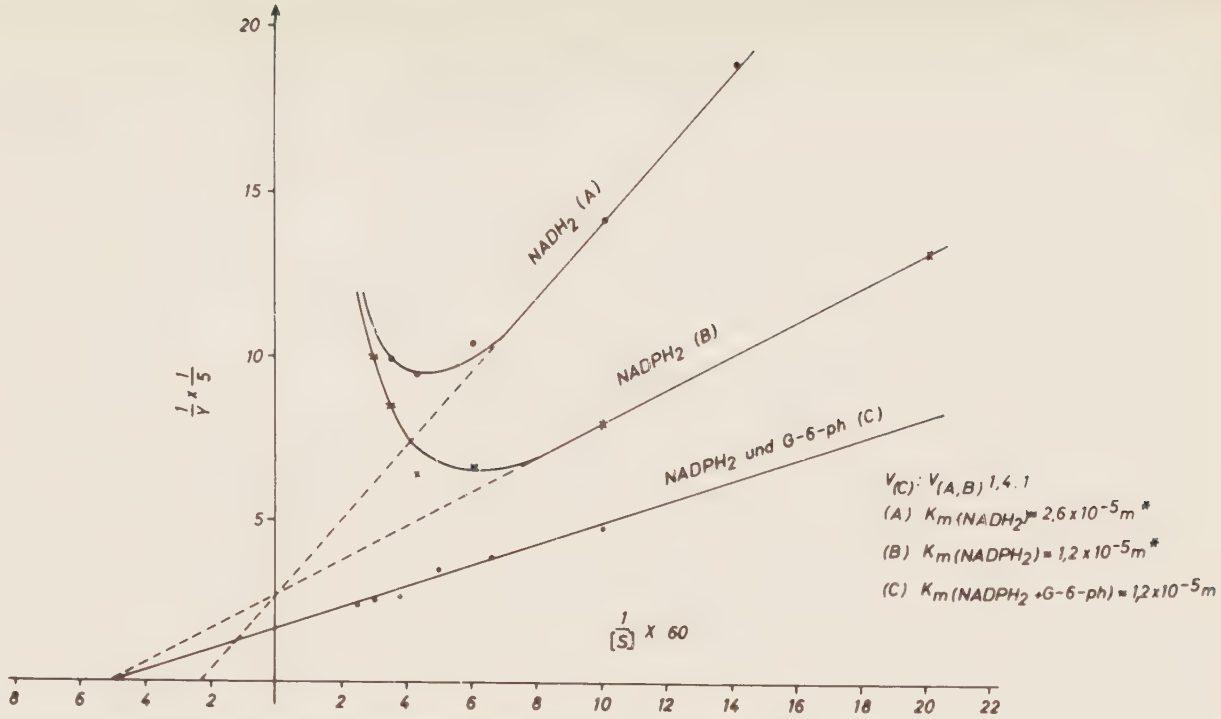


Abb. 30: Vergleich der Aktivität der 3-Acetylpyridin-Hydrogenase aus Rattenleber bei:
(A) äquimolarer Erhöhung von 3-AP und $NADH_2$ als Wasserstoffdonator
(B) äquimolarer Erhöhung von 3-AP und $NADPH_2$ als Wasserstoffdonator
*(C) Erhöhung von 3-AP bei konstantem System von $NADPH_2$ und Glucose-6-phosphat als Wasserstoffdonator (vergl. Tafel 17a und 17b) * Substrathemmung, Wert durch Extrapolieren gewonnen*

Mit zwei weiteren Versuchsreihen untersuchten wir die P-3-Mc-Entstehung nach verschiedenen Inkubationszeiten. Die Entstehung von Nicotinsäure und 3-Acetyl-6-pyridon wurde ebenfalls berücksichtigt. In Abbildung 31 ist die Konzentration der aus 3-AP entstandenen Pyridinbasen als Funktion der Inkubationszeit aufgetragen (Zeit-Umsatz-Kurve). Für die eine Versuchsreihe wählten wir den in Kapitel D,II,S.54 angegebenen "Optimalansatz" mit 8,3μmol 3-AP, der äquimolaren Menge $NADPH_2$ und Glucose-6-phosphat im Überschuss; für die andere Versuchsreihe wurde ein Ansatz mit 16,6μmol/3-AP und 10μmol NAD pro ml verwendet (vgl.Kap.D, I ,S.39). Die Versuche wurden nach 10,20,40,80,120 und 160 Minuten unterbrochen und die Konzentration der 3-AP-Metaboliten ermittelt.
Die P-3-Mc-Konzentration stieg bei zunehmender Inkubationszeit an und näherte sich asymptotisch einem Grenzwert, während die Nicotinsäure- und 3-Acetyl-6-pyridon-Konzentration immer auf derselben Höhe blieb.
Hier wären noch Versuche zu erwähnen, welche die pH-und Temperaturabhängigkeit der 3-AP-Hydrierung klären sollten:

In einem pH-Bereich zwischen 6,9 und 7,6 konnten wir keine signifikanten Unterschiede in der P-3-Mc-Ausbeute feststellen.

Auch Temperaturveränderungen zwischen 35° und 45° hatten keinen signifikanten Einfluss auf die P-3-Mc-Ausbeute. Allerdings ist unsere quantitative Bestimmungsmethode auch zu grob, um kleinere Schwankungen in der Ausbeute erfassen zu können.

Wir führten daher alle Versuche bei pH-Werten zwischen 7,3 und 7,4 und einer Temperatur von 40°C durch.

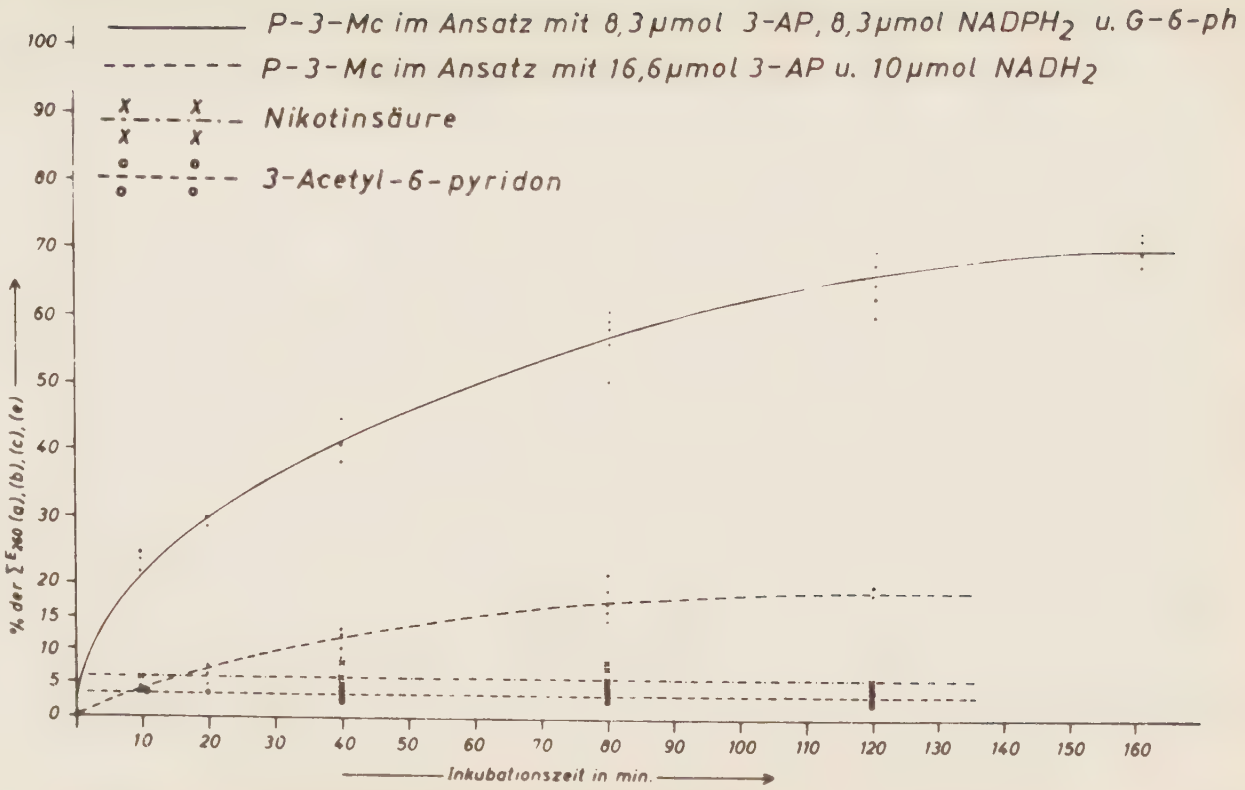


Abb 31. 3-AP-Metaboliten-Konzentration nach verschiedener Inkubationszeit

IV : Versuche mit einzelnen Zellfraktionen und verschiedenen Geweben.

1) Zellfraktionen

Um festzustellen, wo die 3-AP-Hydrogenase lokalisiert ist, unternahmen wir in vitro-Versuche mit einzelnen Zellfraktionen.
Wir untersuchten drei Fraktionen aus Lebergewebe:

a) Mitochondrien
b) Mikrosomen
c) Überstand 100.000 g

Die Fraktionen waren mehrmals gewaschen und wie beschrieben hergestellt worden (Kap. C,II,1, Seite 32). Mit jeder Zellfraktion wurden sowohl mit $NADPH_2$ wie auch mit $NADH_2$ Versuche durchgeführt.

a) Mit Mitochondrien waren alle 3-AP-Metaboliten entstanden und ausserdem mehr Nicotinsäureamid sowie mehr Substanz in Bande (f) als bei den übrigen Fraktionen.

b) Mit Mikrosomen fehlte die P-3-Mc-Bande. 3-AP wurde also nicht von ihnen hydriert. 3-Acetyl-6-pyridon und Nicotinsäure waren in üblicher Stärke erschienen. Während nur wenig Nicotinsäureamid und Bande (f) von den Cofermenten abgespalten worden war.

c) Mit Überstand 100.000 g waren wieder alle Banden entstanden, jedoch mit einem quantitativen Unterschied zur Mitochondrienfraktion (siehe Tafel 18 und Abb.32).

Diese Ergebnisse zeigen, dass die 3-AP-Hydrogenase nur in der Mikrosomenfraktion nicht vorhanden ist, während sie sowohl in den Mitochondrien wie auch gelöst im Zellplasma vorkommt.

Zahl der Versuche	Gewebe oder Gewebsfraktion	Co-ferment	% der $\sum E_{260}$ a,b,c,e P-3-Mc	NS	3-A-6-pyr	E_{260} NA/ µmol Coferment
5	Mitochondrien (Leber)	NADPH	27,1	5,3	4,7	1656
5		$NADH_2$	14,3	5,4	3,1	2677
3	Mikrosomen (Leber)	NADPH	0	5,9	4,5	487
3		$NADH_2$	0	6,7	3,6	769
3	Überstand 100 000 g (Leber)	NADPH	12,4	6,4	3,6	373
3		$NADH_2$	8,5	6,0	4,7	680
5	Gehirn (Überstand 2000 g)	NADPH	7,7	3,2	≤1	401
5		$NADH_2$	0	2,5	≤1	562
4	Niere (Überstand 2000 g)	NADPH	10,3	6,4	0	521
4		$NADH_2$	5,1	4,1	0	933

fel 18: Quantitative Auswertung von Versuchen mit verschiedenen Zellfraktionen und verschiedenen Geweben.
Die Ansätze enthielten 14 µ mol 3-AP und die gleiche Menge Coferment und wurden 60 min bei 40°C inkubiert.

2. Hirngewebe

Über die Versuchsergebnisse mit Leberzellpraeparationen wurde in den vorhergehenden Kapiteln ausführlich berichtet.

Da KANIG das P-3-Mc aus dem Gehirn 3-AP vergifteter Ratten isoliert hatte, bemühten wir uns festzustellen, ob diese Hydrierung auch bei in-vitro-Versuchen mit Hirngewebe gelingt. Wir verwandten eine Praeparation, bei der Kerne, Zellreste und Achsenzylinder mit 2000 g abzentrifugiert waren und legten als Coferment wiederum $NADH_2$ bzw. $NADPH_2$ vor.

Mit $NADH_2$ erhielten wir kein P-3-Mc, wohingegen dieses mit $NADPH_2$ als Coferment entstand (vgl.Abb. 32).
Die Banden in Höhe von Nicotinsäure und 3-Acetyl-6-pyridon waren so schwach, dass wir sie nicht identifizieren konnten.

3. Nierengewebe

Als weiteres Organ untersuchten wir die Niere, bei der wir ebenfalls mit Überstand 2000 g arbeiteten. Bei der Bildung von P -3-Mc zeigte sich nur ein quantitativer Unterschied zum Lebergewebe. Das Carbinol war mit beiden Cofermenten entstanden. Jedoch trat bei allen Versuchen mit Nierengewebe kein 3-Acetyl-6-pyridon auf, woraus wir schliessen, dass die Niere nicht befähigt ist, 3-AP zu 3-Acetyl-6-pyridon zu oxydieren (Abb.32 und Tafel 18).
Somit muss dieser Metabolit, den NEUHOFF im Urin nachgewiesen hat, aus der Leber stammen.

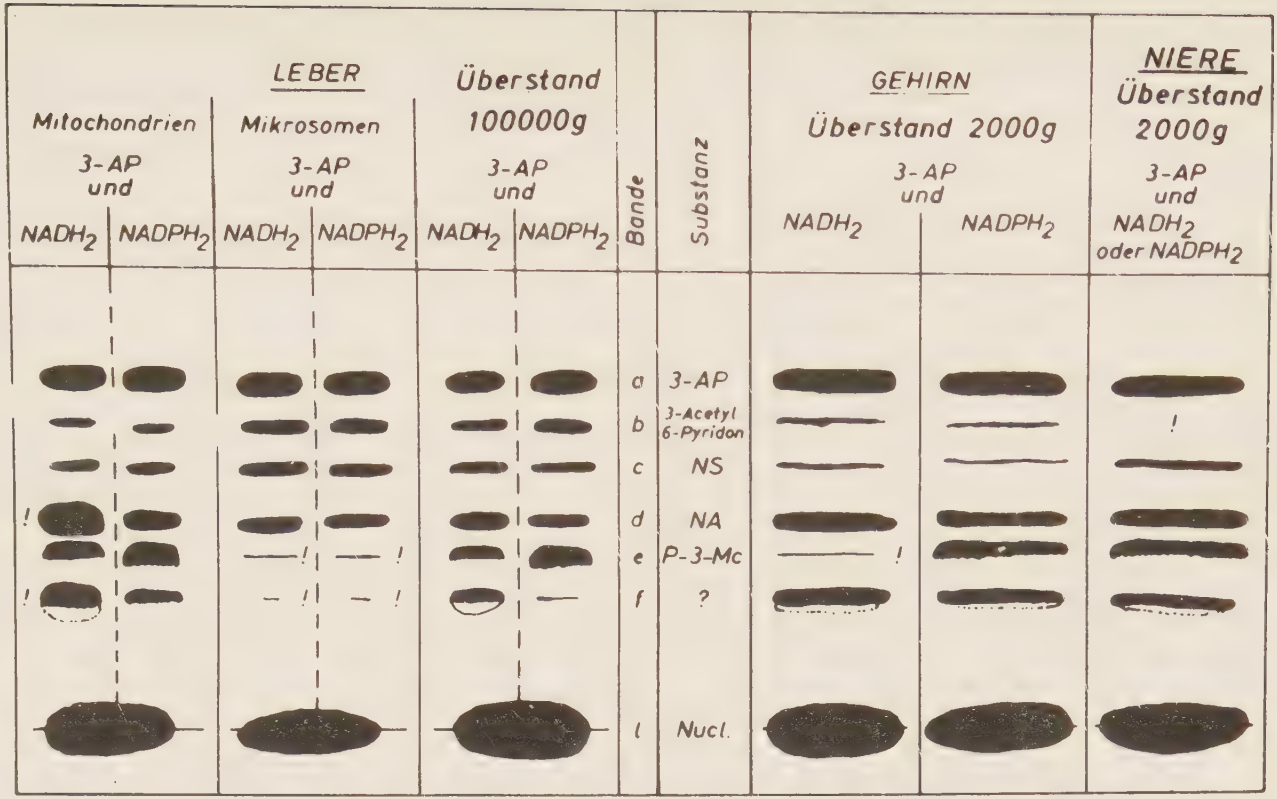


Abb.32: DC-Chromatogramme von Versuchen mit verschiedenen Zellfraktionen und versch. Geweben.

VII : Versuche mit Dehydrogenasen.

Wir hatten gefunden, dass die Hydrierung des 3-AP in Leber, Niere und Gehirn möglich ist. Daraus kann auf ein in diesen Organen vorkommendes Ferment geschlossen werden, das vor allem, wie unsere Versuche zeigten, in den Mitochondrien aber auch im Plasma vorkommt. Als Coferment können sowohl $NADH_2$ wie auch $NADPH_2$ dienen.
Diese Gegebenheiten und darüberhinaus die Tatsache, dass beim 3-AP eine Ketogruppe hydriert wird, führten zu der Frage, ob 3-AP von der Isocitricodehydrogenase (ICDH) hydriert wird. Diese ist ein in den Mitochondrien lokalisiertes, aber auch im Zellplasma gelöst auftretendes Ferment des Citronensäurezyklus (55,67 vgl.Abb.33). Die ICDH wurde zuerst von GRAFFLIN und OCHOA (27), später von MOYLE und DIXON (56) gereinigt dargestellt. SIEBERT und Mitarbeiter (68,69) erzielten eine noch weitergehende Reinigung des Fermentes und erreichten eine spezifische Aktivität von 12 000 E gegenüber 800 E, die OCHOA erzielte. An diesem hochgereinigten Präparat studierten verschiedene Autoren (13,14,23,51,63, 67,68,69) die Eigenschaften des Enzyms.

Der ICDH sind vier Umsetzungen zuzuschreiben (siehe auch Abb.33; Abkürzungen nach SIEBERT 68,69)

a) die IDH-Reaktion (oxydative Decarboxylierung)
   Isocitrat + NADP→ α-Ketoglutarat + CO_2 + $NADPH_2$.
b) die Umkehrung der IDH-Reaktion (reduktive Decarboxylierung oder auch "OCHOA-Reaktion" genannt):
   α-Ketoglutarat + CO_2 + $NADPH_2$→ Isocitrat + NADP
c) die OSAR-Reaktion (Oxalbernsteinsäurereduktase-Reaktion):
   Oxalsuccinat + $NADPH_2$→ Isocitrat + NADP
d) die OSADC-Reaktion (Oxalbernsteinsäuredecarboxylase-Reaktion:
   Oxalsuccinat→ α-Ketoglutanat + CO_2

Die genannten Autoren fanden, dass alle vier Reaktionen von demselben Ferment katalysiert werden und dass die Oxalbernsteinsäure nur in einer fest an das Enzym gebundenen Form als Zwischenprodukt vorliegt.

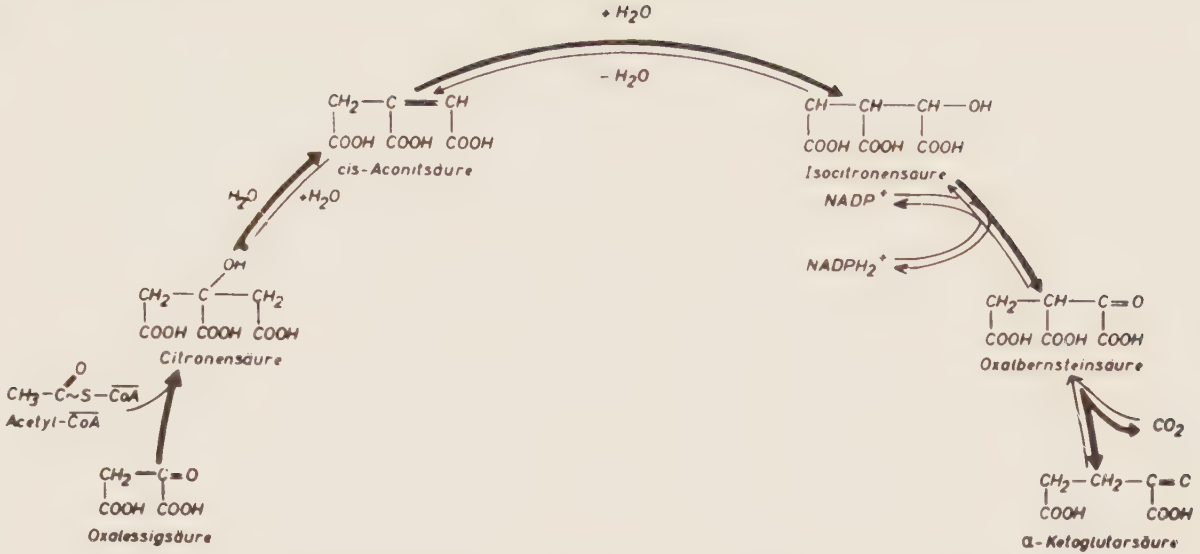


Abb. 33. Der Citronensäurezyklus von der Oxalessigsäure bis zur α-Ketoglutarsäure.

Weiterhin untersuchten die Autoren die Abhängigkeit des Enzyms von der Anwesenheit von Mn^{++}- und Mg^{++}-Ionen:
Mn^{++}-Ionen aktivieren dreimal stärker als Mg^{++}-Ionen. Eine der beiden Ionenarten ist jedoch für die ICDH-Reaktion unbedingt erforderlich.

LOTSPEICH und PETERS (52) hatten schon Jahre vorher entdeckt, dass sich die ICDH-Reaktion durch p-Chlormercuribenzcat hemmen lässt und zwar mit der Konzentration von 4×10^{-8}m.

Eigene Untersuchungen :

Orientierende Untersuchungen wurden mit zwei käuflichen ICDH-Präparaten (siehe Kap. C,II,4,S.38.) unternommen und zwar unter ähnlichen Bedingungen wie bei den in-vitro-Versuchen mit Gewebepräparationen. Diese wurden durch das Ferment ersetzt und die Ansätze wie üblich 120 Minuten bei 40°C in Wassermannröhrchen inkubiert (siehe Kap. C,II,3,S.35 Ansatz 1). Bei der Dünnschichtchromatographischen Auswertung der enteiweissten Proben konnte ausser der 3-AP-Bande eine zweite kleinere Bande isoliert werden, die denselben Rf-Wert wie P-3-Mc hatte. Durch Rechromatographie in vier Fliessmitteln und Schreibung des UV-Spektrums konnte die Substanz dieser zweiten Bande eindeutig als P-3-Mc identifiziert werden. 7% des inkubierten 3-AP waren hydriert worden (siehe Tafel 20). Im Leerversuch ohne ICDH war kein P-3-Mc entstanden.
Bei orientierenden Versuchen, die wir auf gleiche Weise mit der Alkoholdehydrogenase und der Lactatdehydrogenase durchführten, wurde 3-AP nicht hydriert.
Durch das Ergebnis mit der ICDH ermutigt, versuchten wir diese Reaktion direkt im Spectralphotometer zu verfolgen. Ansatz (3) (siehe Kap.C,II,3, S.35), von SIEBERT und Mitarbeitern (69) für die OSAR-Reaktion (Oxalsuccinat + $NADPH_2$ $\rightarrow$ Isocitrat + NADP) angegeben, wurde übernommen und nur dadurch abgewandelt, dass an die Stelle des Oxalsuccinats 3-AP gesetzt wurde. Wir starteten die Reaktion durch Hinzufügen des Enzyms und verfolgten die

Minuten	1. Versuch Probe A	1. Versuch Probe B	2. Versuch Probe A	2. Versuch Probe B	3. Versuch Probe A	3. Versuch Probe B
1	80	60	120	90	100	80
2	50	49	80	65	75	70
3	35	16	50	30	60	50
4	25	15	30	25	50	20
5	13	10	25	10	35	15
6	10	6	10	8	25	15
7	7	6	10	6	13	10
8	7	2	8	5	10	5
9	3	0	7	0	7	4
10	5	3	2	5	7	1
11	0	0	3	0	3	0
12	0	0	0	0	5	1
13	2	0	0	0	0	0
14	0	0	1	0	2	1
15	0	0	0	0	0	0

Tafel 19: Reaktionsgeschwindigkeit der Ochoa-Reaktion mit und ohne 3-AP-Zusatz. Probe B enthält 3-AP; Probe A nicht. Angegeben ist die Extinktionsabnahme ($E_{260} \times 1000$) pro Minute. Gemessen wurde bei 340 mμ. Die 3 Versuche wurden unter denselben Bedingungen und bei Zimmertemperatur durchgeführt. Die Extinktion lag jeweils zu Beginn der Reaktion bei $E_{260} \approx 800$.

Extinktionsabnahme bei 340 mμ. Die Umsetzung kam jedoch unter den beschriebenen Bedingungen nicht in Gang. Extinktionsunterschiede gegenüber der Kontrollküvette konnten selbst nach Stunden und bei einer Inkubationstemperatur von 40°C nicht ermittelt werden. Veränderungen des Ansatzes (3) durch relative Erhöhung und Erniedrigung der 3-AP-Konzentration waren gleichfalls erfolglos.

Eine weitere Versuchsreihe im Spektralphotometer sollte klären, ob 3-AP überhaupt mit der ICDH in Beziehung tritt und dadurch etwa die eigentlichen Reaktionen des Enzyms beeinflusst. Wir führten nach Angaben von SIEBERT (69) die OCHOA-Reaktion (α - Ketoglutarat + CO_2 + $NADPH_2$ Isocitrat + NADP) einmal mit, einmal ohne 3-AP-Zugabe durch (siehe Kap.C,II,3, S.36 , Ansatz 4). Bei den Proben B, denen 3-AP zugefügt worden war, war die Extinktionsabnahme geringer und die Reaktion früher beendet als bei den Proben A, die kein 3-AP enthielten (siehe Tafel 19). Die OCHOA-Reaktion wird also von 3-AP in geringem Masse gehemmt.

Da 3-AP unter den Bedingungen der spektralphotometrischen Untersuchung nicht nachweislich hydriert wurde, gingen wir wieder zu den in-vitro-Versuchen mit grösseren Konzentrationen im Ansatz über (wie zu Beginn dieses Kapitels beschrieben). Wir veränderten Ansatz (1), indem wir $NADPH_2$ im Überschuss vorlegten und die 3-AP-Konzentration pro ml Ansatz reduzierten (siehe Kap.C,II,3,S.35 , Ansatz 2).

Dadurch kamen wir zu einer P-3-Mc-Ausbeute von 26% des eingesetzten 3-AP (siehe Tafel 20). Dies gelang mit beiden uns zur Verfügung stehenden ICDH-Präparaten. Eine weitere Erhöhung der Ausbeute konnten wir nicht erzielen auch nicht durch noch stärkere Reduzierung der 3-AP-Konzentration.

Wenn wir unserem Ansatz p-Chlormercuribenzoat zufügten und zwar in der Konzentration von 5×10^{-5} Mol, so war die P-3-Mc-Entstehung total zu hemmen.

Gleichfalls gehemmt wurde die Reaktion durch Äthylendiamintetraessigsäure (ÄDTE) in einer der $Mn\,SO_4$-Konzentration äquimolaren Menge.

Zahl der Versuche	ICDH E/ml	3-AP µ mol/ml	$NADPH_2$ µ mol/ml	Hemmstoff	Entstandenes P-3-Mc in % des inkubierten 3-AP
5	400	8	5	--	7
5	400	10	12	--	15,4
10	400	5	10	--	26
4	400	5	10	p-Chlormercuri-benzoat 5×10^{-5} molar	--
4	400	5	10	ÄDTE mit $MnSO_4$ äquimolar	--
10	400	--	10	Leerversuch	--

afel 20: Quantitative Auswertung der in vitro-Versuche mit Isocitridehydrogenase.
Die P-3-Mc-Werte wurden auf eine 100%ige methodische Ausbeute umgerechnet.

Durch diese wird nämlich das Manganiumion komplex gebunden und steht so der Reaktion nicht mehr als Aktivator zur Verfügung.

Diese Versuchsergebnisse legen es nahe, in der ICDH das hydrierende Ferment des 3-AP zu sehen. Dennoch scheint es angebracht, dieser Annahme mit einiger Zurückhaltung zu begegnen, da es uns bisher nicht gelang, einige wesentliche Fragen aufzuklären:
Bei unseren Versuchsreihen mussten wir ab und zu feststellen, dass die oben besprochene 3-AP-Hydrierung nicht vonstatten ging, obgleich völlig gleiche Versuchsbedingungen (Ansatz 4 vorlagen. Das war bei 40% der Versuche der Fall. Wir konnten bislang die Gründe für diese schlechte Reproduzierbarkeit nicht klären.

Weiter ist ungeklärt, warum 3-AP, selbst bei hohem NADP-Überschuss und hoher Fermentkonzentration, nur zu einem kleinen Teil, 26%, hydriert wird.
Wir können also wiederholend feststellen:

Wenn 3-AP in vitro mit der $NADPH_2$-abhängigen Isocitricodehydrogenase längere Zeit inkubiert wurde, wurden unter günstigen Bedingungen 26% des 3-AP zu P-3-Mo hydriert und zwar sowohl mit dem Präparat der Firma Boehringer wie mit dem der Firma Sigma.

Die in diesen Handelspräparaten als "Fremdaktivitäten" angegebenen Fermente, die Aconitase und die NADabhängige ICDH, können die Hydrierung nicht verursachen, da die erstere keine Hydrogenase ist und der zweiten das Coferment fehlt.

Die Reaktion war nicht regelmässig reproduzierbar.

Durch p-Chlormercuribenzoat war die Hydrierung total hemmbar. Mit anderen wasserstoffübertragenden Fermenten wie der LDH und ADH wurde 3-AP nicht hydriert.

Eine Hemmung der normalen ICDH-Reaktion, wie etwa der "OCHOA Reaktion" durch 3-AP, konnte nachgewiesen werden.

E : DISKUSSION :

In dieser Arbeit wird der Dünnschicht-Chromatographie(DC) ein breiter Raum gewidmet. Wir bemühten uns besonders darum, den Wert der einzelnen Trennverfahren gegeneinander abzugrenzen und zu zeigen, dass erst die Kombination verschiedener Verfahren optimale chromatographische Trennungen ermöglicht.
Wenn es KANIG und KORANSKY (33,34,49) gelungen war, für die Auftrennung der freien Nucleotide aus Gehirnextrakten mit der Gradientenelution an Ionenaustauschern eine qualitativ gute Methode zu entwickeln, so ist daneben die Dünnschicht-Chromatographie für die Auftrennung kleinster Mengen von Substanzen als optimales Verfahren anzusehen. Auch aus unseren Untersuchungen geht hervor, dass die DC durch ihr hohes Auflösungsvermögen, ihre niedrige Nachweisgrenze und ihren geringen Zeitaufwand der Papier-Chromatographie(PC) überlegen ist. Diese Vorteile machen die DC zum idealen Trennverfahren für grössere Untersuchungsreihen, insbesondere wenn nur eine qualitative Aufschlüsselung verlangt wird.

Für quantitative Untersuchungen hat die DC die gleichen Nachteile wie die PC. Bei der DC darf jedoch der Vorteil nicht übersehen werden, dass es die Schnelligkeit des Verfahrens gestattet, grosse Untersuchungsreihen durchzuführen. Wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, sind dann doch quantitative Aussagen möglich. Die DC eignet sich jedoch unserer Ansicht nach nicht für die saubere Trennung von Nucleotiden aus Gewebsextrakten. Für diese Fragestellung bleibt nach wie vor die Ionenaustausch-Chromatographie das optimale Verfahren, wobei die DC als ergänzende Methode durchaus ihre Berechtigung hat. Wir veränderten z.B. die von RANDERATH und anderen angegebenen Fliessmitteln soweit, dass aus den kleinen Probemengen eines in vitro-Ansatzes eine

annähernde Auftrennung der enthaltenen Nucleotide möglich war. Vor allem verfeinerten wir aber die DC für die Auftrennung von Pyridinbasen und erprobten fünf Fliessmittel, die sich gegenseitig so gut ergänzten, dass sie eine einwandfreie qualitative Aufschlüsselung ermöglichten.

Durch die Anwendung der Hochspannungs-Elektrophorese wollten wir das elektrochemische Verhalten verschiedener Nucleotide und Pyridinbasen untersuchen und konnten dabei auch zeigen, dass die Verwendung von Cellulosedünnschichtplatten an Stelle von Elektrophoresepapier zu bedeutend schärferen Trennungen führt. Darüber hinaus war uns mit diesem Verfahren eine Trennung des oxydierten Cofermentes NADP bzw. NAD vom reduzierten Coferment $NADPH_2$ bzw. $NADH_2$ möglich, was sonst nur mit sehr aufwendigen Verfahren gelingt. Orientierende Versuche mit der Dünnschicht-Hochspannungs-Elektrophorese, bei denen wir Testsubstanzen benutzten, zeigten eine gute gleichzeitige Auftrennung sowohl der Nucleotide als auch der Basen, wobei die ersteren zur Kathode, die letzteren zur Anode wanderten. Leider entsprach aber die Auftrennung unserer enteiweissten in-vitro-Ansätze nicht den Erwartungen. Die elektrophoretische Auftrennung wurde durch die im Ansatz enthaltenen Elektrolyte gestört, so dass wir schliesslich unseren Plan einer gleichzeitigen Auftrennung von Basen und Nucleotiden aufgeben mussten. Mit Hilfe der beschriebenen und von uns erprobten chromatographischen Trennverfahren waren wir in der Lage, den Stoffwechsel des 3-Acetylpyridins in vitro zu verfolgen.

Schon BEHER und Mitarbeiter (5) hatten in vitro-Versuche mit 3-AP durchgeführt. Doch in Ermangelung geeigneter Verfahren gelang es ihnen lediglich, das Verschwinden von 3-AP mit inkubierten Gewebstückchen nachzuweisen. Sie fanden,

dass nach 2 Stunden 50% des zugefügten 3-AP verschwunden waren und nahmen an, dass es via Nicotinsäure verstoffwechselt wird. Diese Möglichkeit muss nach unseren Untersuchungen jedoch angezweifelt werden. Wir glauben vielmehr, dass das 3-AP zu P-3-Mc hydriert wurde; denn wir konnten in unseren Versuchen eine Hydrierung bis zu 50% und mehr nach 2 Stunden nachweisen, wenn genügend hydrierendes Coferment zur Verfügung steht. Dies ist in Gewebeschnitten der Fall. BEHER inkubierte 3-AP auch mit Leberzellhomogenat ohne Cofermentzugabe und fand dabei keine Verstoffwechselung, während wir mit unseren Trennverfahren nachweisen konnten, dass zumindest 5% des eingesetzten 3-AP verstoffwechselt wurden. Der Hauptmetabolit war in diesem Falle das 3-Acetyl-6-pyridon.

KANIG hatte schon bei der Aufarbeitung der Gehirne 3-AP-vergifteter Ratten diese Substanz gefunden, aber noch nicht identifiziert.

NEUHOFF gelang es, 3-Acetyl-6-Pyridon aus dem Urin 3-AP-vergifteter Ratten zu isolieren. Es ist jedoch nicht anzunehmen, dass diese Substanz in der Niere gebildet wird, da sie bei unseren Untersuchungen zwar mit Lebergewebe, nicht aber mit Nierengewebe entstand. Daraus ist zu schliessen, dass das im Urin gefundene 3-Acetyl-6-pyridon aus der Leber stammt.

Welche Rolle diese Substanz im Stoffwechsel des 3-AP spielt, ist noch unbekannt. Sicherlich lässt sie sich nicht in das von uns (Tafel I) oder das von MacKENNIS (Abb. 10) angegebene Schema einordnen und ist als ein zusätzliches Abbauprodukt des 3-AP anzusehen. Der tierische Organismus besitzt also die Fähigkeit, den 3-Acetylpyridinring in Stellung 6 zu oxydieren, ein Vorgang, den schon THIERFELDER und DAIBER (71) am Beispiel des Acetophenons demonstriert haben.

In unseren Versuchen entstand das 3-Acetyl-6-pyridon stets in einer fast konstanten Höhe von 5%. Wir können dafür keine Erklärung geben, doch ist anzunehmen, dass die sehr empfindlichen oxydierenden Enzyme, die wahrscheinlich in den Mikrosomen lokalisiert sind, in unseren Ansätzen sehr rasch zugrunde gingen. Wir dachten auch an die Substrathemmung. Es wäre durchaus möglich, dass sie bei oxydierenden Fermenten schon bei sehr niedrigen Konzentrationen auftritt. Diese Annahme konnten wir jedoch nicht bestätigt finden: Unsere Methoden erlaubten uns schliesslich mit 1 µmol 3-AP/ml Ansatz zu arbeiten. Selbst bei so wenig Substrat war die 3-Acetyl-6-pyridon-Ausbeute keineswegs erhöht, sondern überschritt ihren konstanten Wert nicht.

Versuche mit Leber-Homogenat und 3-AP führten zu keiner bemerkenswerten Hydrierung des 3-AP. Zur genaueren Untersuchung dieser Reaktion war es nötig, den Ansätzen hydrierende Cofermente zuzufügen. Als solche boten sich $NADH_2$ und $NADPH_2$ an. Mit beiden Cofermenten war die Hydrierung möglich; es ergaben sich jedoch quantitative Unterschiede, die so gross waren, dass sie mit der Dünnschicht-Chromatographie ohne Schwierigkeit nachgewiesen werden konnten. Diese Ergebnisse werfen die Frage auf, ob an der Hydrierung entweder nur ein einziges Apoferment beteiligt ist, das mit beiden Cofermenten arbeiten kann und lediglich zum NADP eine grössere Affinität besitzt, oder ob zwei Fermente, ein NAD- und ein NADP-abhängiges, vorliegen. Als dritte Möglichkeit ist zu diskutieren, ob nicht durch eine Transhydrogenase der Wasserstoff des vorgegebenen Coferments auf das andere benötigte übertragen wird. Man könnte also annehmen, dass z.B. nur ein einziges 3-AP-hydrierendes Ferment vorliegt und dieses etwa vom NADP abhängig wäre. Wird nun $NADH_2$ dem Ansatz zugegeben, so könnte der Wasserstoff durch eine Transhydrogenase auf die kleinen

Mengen des im Ansatz ohnehin vorhandenen NADP übertragen werden, und so die Reaktion zustande kommen.

Diese im Ansatz aus der Gewebepräparation stammende Menge des nicht vorgelegten Coferments muss jedoch als sehr niedrig angesehen werden. Demnach müsste ein bei weitem grösserer quantitativer Unterschied als nur das Doppelte zwischen beiden Cofermenten bestehen, zumal die Hydrierung des 3-AP relativ langsam vor sich geht. Erst nach 2 Stunden sind 50% hydriert, obwohl wir eine ziemlich grosse Menge 3-AP dem Ansatz zufügten.

Der Annahme, dass nur ein Apoferment vorhanden sei, widerspricht, dass bis jetzt kein Ferment bekannt ist, das gleichzeitig sowohl mit NADP als auch mit NAD reagieren kann. Ausserdem wäre dann unser Befund unerklärlich, dass P-3-Mc im Hirngewebe nur mit NADP entsteht. Man muss also vielmehr annehmen, dass sowohl in der Leber als auch in der Niere zumindest zwei Fermente, je ein NAD- und ein NADP-abhängiges, vorliegen, deren Reaktionsgeschwindigkeit mit 3-AP verschieden gross ist. Im Hirn dagegen scheint nur das NADP-abhängige Ferment vorhanden zu sein.

Betrachtet man jedoch das Lineweaver-Burk-Diagramm (Abb. 30) unter diesem Gesichtspunkt, so fällt auf, dass sich für die 3-AP-Hydrogenase-Reaktion zwei verschiedene Sättigungskurven ergeben, je nachdem ob $NADPH_2$ oder $NADH_2$ Coferment ist. Es ist aber erstaunlich, dass wir durch Extrapolieren der beiden Kurven einen gleichen Wert für $1/V_{max}$ bei $1/S=0$ erhalten. Dieses Verhalten aber spricht für das Vorhandensein von nur einem Enzym, das mit beiden Cofermenten reagiert, von ihnen aber in verschiedener Weise aktiviert oder gehemmt wird. Unsere Ergebnisse zeigen nämlich, dass sich die Reaktionsgeschwindigkeit nur bis zu einer Cofermentkonzentration von 12 bis 14 μmol/ml Ansatz steigert, bei höheren Konzentrationen aber vermindert. Diese Enzymhemmung tritt bei der alleinigen Erhöhung der 3-AP-Konzentration nicht auf (s.Versuch C,Abb.30)

Unser Lineweaver-Burk-Diagramm basiert auf Dünnschichtchromatographisch ermittelten Werten und kann daher nur eine grobe Orientierung, nicht aber eine exakte Kinetik der 3-AP-Hydrogenase vermitteln. Es ist infolgedessen durchaus möglich, dass der gleiche Wert für V_A und V_B auf Grund methodischer Mängel zustande kam. Eine endgültige Klärung, ob ein oder zwei 3-AP-Hydrogenasen existieren, wird erst durch die Reindarstellung des Enzyms möglich werden.

Eine Reindarstellung des Enzyms ist bislang nicht gelungen. Deshalb überprüften wir zunächst käufliche Dehydrogenasen auf ihre Fähigkeit,3-AP zu hydrieren. Dies gelang mit der ICDH, obwohl man sich nicht ohne weiteres vorstellen kann, dass ein so substratspezifisches Ferment die Seitenkette eines Pyridinring**es** anstelle des Oxalsuccinats hydrieren kann. Wir hatten auch etliche Schwierigkeiten bei den Versuchen mit der ICDH,und es war uns nicht möglich, das Problem einwandfrei zu klären. Sicher ist nachgewiesen, dass P-3-Mc mit ICDH und $NADPH_2$ entstand. Doch waren die Versuche aus unerklärlichen Gründen nicht immer reproduzierbar und ausserdem verlief die Reaktion so langsam, dass wir sie im Spektralphotometer nicht verfolgen konnten. Andererseits konnten wir doch zeigen, dass 3-AP mit der ICDH auf irgendeine Weise in Beziehung tritt, da eigentliche Umsetzungen des Enzyms wie die OCHOA-Reaktion durch 3-AP hemmend beeinflusst werden. Wir sind der Meinung, dass die ICDH das 3-AP-hydrierende Ferment ist, dass es uns aber nicht gelungen ist, so günstige Verhältnisse für die Reaktion zu schaffen, wie sie offenbar in Gewebepräparationen und in vivo vorliegen.

Versuche mit Gewebepräparationen zeigten, dass unter günstigen Bedingungen ein grosser Teil (70%) des 3-AP zu P-3-Mc hydriert wird. Damit können wir annehmen, dass in vivo, wo ohnehin reduziertes Coferment immer zur

Verfügung steht und die 3-AP-Konzentration niedrig ist, ein grosser Teil des 3-AP - nach KANIG (33) knapp die Hälfte - in ein bis zwei Stunden zu P-3-Mc verstoffwechselt wird und auch in dieser Form im Gewebe vorliegt.

Interessant scheint noch die Frage zu sein, was weiterhin mit dem P-3-Mc im Organismus geschieht. KANIG konnte bei seinen Untersuchungen feststellen, dass nach 16 Stunden kein P-3-Mc im Gehirn mehr auffindbar ist (33). Im Urin konnte P-3-Mc nicht gefunden werden, abgesehen von Spuren des N-Methyl-pyridin-3-methylcarbinols, die MAC KENNIS und Mitarbeiter (47) fanden. BEHER (6) fand bei der Applikation von ^{14}C-markiertem 3-AP nach 24 Stunden 30 % der applizierten Aktivität in der Atemluft und postuliert daher den in Tafel I und Abbildung 10 demonstrierten Abbau des 3-AP zu Nicotinsäure.

Bei unseren in vitro-Versuchen stieg die P-3-Mc-Bildung in Abhängigkeit von der Zeit, ohne dass ein weiterer Abbau des P-3-Mc nachgewiesen werden konnte. Eine Arbeit von HEIDINGER (30) greift deshalb das Problem des 3-AP-Abbaus zu Nicotinsäure erneut auf.

F: ZUSAMMENFASSUNG

Mit 3-Acetylpyridin (3-AP), einem Antimetaboliten des Nicotinsäureamid (NA), werden in vitro-Versuche durchgeführt. Insbesondere wird die enzymatische Hydrierung des 3-AP zu Pyridin-3-methylcarbinol (P-3-Mc) untersucht. Mit der Dünnschicht-Chromatographie (DC) gelingt es, einzelne Stoffwechselprodukte zu erfassen. Diese können zum Teil identifiziert und quantitativ bestimmt werden.

Es war zunächst notwendig, methodenkritische Untersuchungen durchzuführen. Mit der Papier-Chromatographie werden die Pyridinbasen nur ungenügend aufgetrennt. Eine einwandfreie Trennung gelingt aber mit der DC. Fünf verschiedene Fliessmittel zur Trennung von Basen werden erprobt. Dabei muss jedoch auf die gleichzeitige Chromatographie der in den Proben enthaltenen Nucleotide verzichtet werden. Diese bleiben bei der Trennung der Basen am Start liegen, können jedoch bei der Rechromatographie ebenfalls mit der DC aufgetrennt werden. Deshalb wird auch auf die DC der Nucleotide eingegangen, und es werden für diesen Zweck geeignete Fliessmittel entwickelt. Die DC wird auf ihre Verlässlichkeit für quantitative Untersuchungen geprüft.

Mit der von uns modifizierten "Dünnschicht-Hochspannungs-Elektrophorese" wird das elektrochemische Verhalten verschiedener Basen und Nucleotide studiert.

Die in vitro-Versuche mit 3-AP ergaben folgende Ergebnisse:

1. Mit Gewebepräparationen der Leber und 3-AP entsteht ohne Cofermentzusatz ein Metabolit des 3-AP, das 3-Acetyl-6-pyridon. Bei Versuchen mit 3-AP und den hydrierenden Fermenten reduziertes Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid ($NADH_2$) und reduziertes Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat ($NADPH_2$) entsteht als weiterer Metabolit P-3-Mc, wobei die P-3-Mc-Ausbeute mit $NADPH_2$ grösser ist als mit $NADH_2$.
2. Die Herkunft der auf der Dünnschicht-Chromatographie ausserdem abgetrennten Nicotinsäure wird nicht geklärt.

Dagegen sind zwei weitere Banden, Nicotinsäureamid und die nicht identifizierte Bande (f), Spaltprodukte der Cofermente. Aus $NADH_2$ entstehen mehr Spaltprodukte als aus $NADPH_2$.

3. Die Versuchsbedingungen werden variiert, bis eine Umwandlung von 75 % des inkubierten 3-AP in P-3-Mc erreicht wird. Die Ausbeute der Hydrierung ist abhängig von der 3-AP- und Coferment-Konzentration im Ansatz. Bei höheren Konzentrationen von Coferment kommt es zu ausgesprochener Fermenthemmung.

4. Eine grobe Kinetik der 3-AP-Hydrogenase wird angegeben. Bei zunehmender Inkubationszeit steigen die P-3-Mc-Werte an, während die Werte für Nicotinsäure und 3-Acetyl-6-pyridon relativ konstant bleiben.

5. Versuche mit einzelnen Zellfraktionen ergeben, dass 3-AP von der Mikrosomenfraktion nicht hydriert wird. Die 3-AP-Hydrogenasen sind sowohl in den Mitochondrien als auch im Zellplasma gelöst zu finden.

6. Bei Versuchen mit verschiedenen Geweben entsteht im Gehirn P-3-Mc nur mit $NADPH_2$, nicht aber mit $NADH_2$. Im Nierengewebe entsteht kein 3-Acetyl-6-pyridon.

7. Versuche mit den Dehydrogenasen Alkoholdehydrogenase (ADH), Lactatdehydrogenase (LDH) und Isocitricdehydrogenase (ICDH) werden beschrieben. Die beiden ersten Enzyme sind inaktiv. Mit der ICDH gelingt es jedoch, 26 % des inkubierten 3-AP zu hydrieren. Mit p-Chlormercuribenzoat ist die Reaktion hemmbar. Die OCHOA-Reaktion wird durch 3-AP gehemmt.

VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN

A D H	Alkoholdehydrogenase
A D P	Adenosin-5'-diphosphat
Ä D T E	Äthylendiamintetraessigsäure
A M P	Adenosin-5'-monophosphat
3 - AP	3-Acetylpyridin
3 - APAD	3-Acetylpyridin-Adenin-Dinucleotid
3 - APADP	3-Acetylpyridin-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
3-A-6-pyr	3-Acetylpyridin-6-pyridon
A P P R	Adenosin-5'-diphosphatribose
A T P	Adenosin-5'-triphosphat
C M P	Cytidin-5'-monophosphat
C S	Citronensäure
D C	Dünnschicht-Chromatographie
D P N	Diphosphopyridinnucleotid (siehe NAD)
E_{260}	UV-Extinktion bei 260 mμ
$E_{spez.}$	spezifische Extinktion
ICDH	Isocitricodehydrogenase
IDH-Reaktion	Oxydative Decarboxylierungsreaktion der ICDH (nach SIEBERT)
I. p. m.	Impulse pro Minute
K G_H	Kieselgel H
KS - Kammer	Trogkammersystem mit Fliesspapier ausgelegt
L D H	Lactatdehydrogenase
N A	Nicotinsäureamid
N A D	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid (früher DPN)
$NADH_2$	reduziertes Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid
N A D P	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat (fr.TPN)
$NADPH_2$	reduziertes Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
N S	Nicotinsäure
P C	Papier-Chromatographie
P - 3 - Mc	Pyridin-3-methylcarbinol
P-3-Mc AD	Pyridin-3-methylcarbinol-Adenin-Dinucleotid
OSAR-Reaktion	Oxalbernsteinsäurereduktase-Reaktion der ICDH (nach SIEBERT)

	Sorptionsmittel
- Kammer	Sandwich-Kammer für die Dünnschicht-Chromatographie
$_{260}^{a,b,c,e}$	Summe der UV-Extinktionen bei 260 mμ von vier aus den Dünnschicht-Chromatogrammen eluierten Pyridinbasen, 3-AP, 3 A-6-pyr, NS und P-3-Mc = Bezugsgrösse

LITERATURVERZEICHNIS

1. ARMSON, J.M. and G.A. HORRIDGE — An Investigation of Factor S of Crustacea. J.Neurochem. 11, 387-395 (1964)

2. BEHER, W.T. and O.H. GAEBLER — Studies of Antimetabolites: I. Pyridine-3-Sulfonic Acid and 3-Acetylpyridine. J.Biol.Chem. 188, 343-349 (1951)

3. BEHER, W.T., W.M. HOLLIDAY and O.H. GAEBLER — II. 3-Acetylpyridine. J.Biol.Chem. 198, 576-578 (1952)

4. BEHER, W.T. and W.L. ANTHONY — III. The Metabolism of 3-Acetylpyridine in Vivo. J.Biol.Chem. 203, 895-898 (1953)

5. BEHER, W.T., S.P. MARFEY, W.L. ANTHONY and O.H. GAEBLER — IV. The Metabolism of 3-Acetylpyridine in Vitro. J.Biol.Chem. 205, 521-525 (1953)

6. BEHER, W.T., G.D. BAKER and M. MADOFF — V. Metabolism in Vivo of 3-Acetylpyridine. J.Biol.Chem. 234, 2388-2390 (1959)

7. BERGMEYER, H.U. — Methoden der enzymatischen Analyse. Verlag Chemie GMBH, Weinheim/ Bergstr. 1962

8. BRODY, T.M. and J.A. BAIN — Am Mitochondrial Preparation from Mammalian Brain. J.Biol.Chem. 195, 685-696 (1952)

9. BRUNNEMANN, A., H. COPER und H. HERKEN — Isolierung von 3-APAD aus dem Gehirn 3-AP vergifteter Ratten. (Isolierung von Diphosphoacetylpyridinnucleotid aus dem Gehirn bei Acetylpyridinvergiftung.) Naturwissenschaften 49, 185-186 (1962) und: Naunyn-Schmiedebergs Arch.exp. Path. 244, 223-236 (1962)

BRUNNEMANN, A., H. COPER und H. HERKEN

Biosynthese von 3-APADP aus NADP.

Naunyn-Schmiedebergs Arch.exp. Path. 245, 541-550 (1963)

BRUNNEMANN, A. und H. COPER

Untersuchungen zur Wirkung des Pyridin-3-methylcarbinol.

Naunyn-Schmiedebergs Arch.exp. Path. 247, 315-317 (1964)

BURTON, R.M.

The Pyridine Nucleotide and Diphosphopyridine Nucleotidase Levels of the Brain of Young Rats.

J.Neurochem. 2, 15-20 (1957)

CHEN, R.F. and G.W.E. PLAUT

Studies on the Hydrogen Transfer Mediated by the DPN-Linked Isocitric Dehydrogenase of Heart.

Biochemistry 2, 752-756 (1963)

CHEN, R.F. and G.W.E. PLAUT

Activation and Inhibition of DPN-Linked Isocitrate Dehydrogenase of Heart by Certain Nucleotides.

Biochemistry 2, 1023-1032 (1963)

CLOTTEN, R. und A. CLOTTEN

Hochspannungselektrophorese.

Georg Thieme Verlag-Stuttgart (1962)

COGGESHALL, R.E. and P.D. MacLEAN

Hippocampal Lesions Following Administration of 3-Acetylpyridine.

Proc.Soc.Exp.Biol. 98, 687-689 (1958)

COPER, H., J. HELGE and H. HERKEN

Über die Wirkung des Hexachlorcyclohexans auf die DPN- und TPN-Nucleosidase des Gehirns.

Naunyn-Schmiedebergs Arch.exp. Path. 243, 99-112 (1962)

COPER, H. und H. HERKEN

Pharmakologische Analyse der 3-Acetylpyridinvergiftung.

Naunyn-Schmiedebergs Arch.exp. Path. 243, 291-293 (1962)

COPER, H.

Die Aktivität der NAD-Nucleosidase in verschiedenen Gebieten des Gehirns

Naunyn-Schmiedebergs Arch.exp. Path. 245, 48-49 (1963)

20. COPER, H. und H. HERKEN
Schädigung des Zentralnervensystems durch Antimetaboliten des Nicotinsäureamids.
Deutsche Medizinische Wochenschrift 88, 42, 2026-2036 (1963)

21. COPER, H. und D. NEUBERT
Reaktionsgeschwindigkeit NADP-abhängiger Oxydoreduktasen aus Rattengehirn mit 3-Acetylpyridin-Adenin-Dinucleotidphosphat.
J.Neurochem. 10, 513-522 (1963)

22. COPER, H.
Der Gehalt an NAD, NADP und Nicotinsäureamid im Gehirn von Ratten nach Einwirkung zentralwirksamer Pharmaka.
Naunyn-Schmiedebergs Arch.exp. Path. 244, 420-428 (1963)

23. ENGLARD, S. and S.P. COLOWICK
On the Mechanism of the Aconitase and Isocitric Dehydrogenase Reactic
J.Biol.Chem. 226, 1047-1058 (1957)

24. FUSE, S. and H. KOIKEGAMI
On the Degenerative Changes of the Hippocampas and Other Brain Structures Induced by Administration of 3-Acetylpyridine.
Acta Anat.Nipponica (Tokyo) 36, 330 (1961)

25. GÄNSHIRT, H. und A. MALZACHER
Trennung einiger Vitamine der B-Gruppe und des Vitamins C durch Dünnschichtchromatographie.
Naturwissenschaften 47, 279-280 (1960)

26. GOLDMAN, D.S.
Enzyme Systems in the Mycobacteria I. The Isocitric Dehydrogenase.
J.Bacteriol. 71, 733-736 (1956)

27. GRAFFLIN, A.L. and S. OCHOA
Partial Purification of Isocitric Dehydrogenase and Oxalosuccinic-carboxylase.
Biochim. et Biophys.acta 4, 205-21((1950)

28. HERKEN, H.
79. Versammlung Süddeutscher Neurologen u. Psychiater (Baden-Baden) (1963)

HERKEN, H. und V. NEUHOFF — Mikroanalytischer Nachweis von Acetylpyridin-adenin-dinucleotid und Acetylpyridin-adenin-dinucleotid-phosphat im Gehirn.
Hoppe-Seyler's Zschr.physiol.Chem. 331, 85-94 (1963)

HEIDINGER, F.P. — Dissertation, Freie Universität Berlin (noch in Bearbeitung)

HICKS, S.P. — Pathologic Effects of Antimetabolites I. Acute Lesions in the Hypothalamus, Peripheral Ganglia and Adrenal Medulla caused by 3-Acetylpyridin and prevented by Nicotinamide.
Amer.J.Pathol. 31, 189-199 (1955)

JOSHI, J.G. and P. HANDLER — Purification and Properties of Nicotinamidase from Torula Cremoris.
J.Biol.Chem. 237, 929-935 (1962)

KANIG, K. — Der Einfluss zentral wirksamer Substanzen auf den Nucleotidstoffwechsel des Gehirns.
Habilitationsschrift an der Freien Universität Berlin (1963)

KANIG, K. und W. KORANSKY — Zur Identifizierung und Bestimmung der freien Nucleotide des Gehirns.
Naunyn-Schmiedebergs Arch.exp. Path. 241, 484-506 (1961)

KANIG, K. und W. KORANSKY — Nachweis von Metaboliten des 3-Acetylpyridins im Gehirn und deren Wirkung auf das ZNS.
Naunyn-Schmiedebergs Arch.exp. Path. 247, 314-315 (1964)

KANIG, K., W. KORANSKY, G. MÜNCH und P.E. SCHULZE — Isolierung eines Metaboliten des 3-AP aus dem Gehirn und seine Identifizierung als P-3-Mc.
Naunyn-Schmiedebergs Arch.exp. Path. 249, 43-53 (1964)

KANIG, K. — Biologische Experimente mit Pyridin-3-methylcarbinol, einem Metaboliten des 3-Acetylpyridin.
in:
Bente,D., and P.B.Bradley (Eds.): Neuro-psychopharmacology, Vol.4, 298-301 (1965), Elsevier, Amsterdam

38. KANIG, K. — Die Bedeutung der B-Vitamine für das Nervensystem.
Symposion über klinische und physiologisch-chemische Probleme der B-Vitamine.
Berlin (30.9.-1.10.1965)
Verlag: S.Karger--Basel (im Druck)

39. KAPLAN, N.O., L.J. ZATMAN and S.P. COLOWICK — Inhibition of Spleen Diphosphopyridine Nucleotidase by Nicotinamide, an Exchange Reaction.
J.Biol.Chem. 200, 197-212 (1953)

40. KAPLAN, N.O. and M.M. CIOTTI — The 3-Acetylpyridine Analogue of DPN.
J.Am.Chem.Soc. 76, 1713-1714 (1954)

41. KAPLAN, N.O., A. GOLDIN, S.R. HUMPHREYS, M.M. CIOTTI and J.M. VENDITTI — Significance of Enzymatically catalyzed Exchange Reactions in Chemotherapy.
Science 120, 437-440 (1954)

42. KAPLAN, N.O., L.J. ZATMAN, S.P. COLOWICK and M.M. CIOTTI — The Isolation and Properties of the Isonicotinic Acid Hydrazide Analogue of Diphosphopyridine Nucleotide.
J.Biol.Chem. 209, 467-484 (1954)

43. KAPLAN, N.O. and M.M. CIOTTI — Chemistry and Properties of the 3-Acetylpyridine Analogue of Diphosphopyridine Nucleotide.
J.Biol.Chem. 221, 823-832 (1956)

44. KAPLAN, N.O., M.M. CIOTTI and F.E. STOLZENBACH — Reaction of Pyridine Nucleotide Analogues with Dehydrogenases.
J.Biol.Chem. 221, 833-844 (1956)

45. KAPLAN, N.O., A. GOLDIN, S.R.HUMPHREYS and F.E. STOLZENBACH — Pyridine Precursors of Mouse Liver Diphosphopyridine Nucleotide.
J.Biol.Chem. 226, 365-371 (1957)

46. KAPLAN, N.O. — Coenzyme Metabolism of the Brain.
in:
Brady, R.O., D.B. Tower (Eds.)
"The Neurochemistry of Nucleotides and Amino Acids", pp. 786
J. Wiley & Sons, Inc., New York, London 1960

KENNIS, H., Jr.L.B. TURNBULL and E.B. BOWMAN — Additional Routes in the Metabolism of 3-Acetylpyridine. J.Biol.Chem. 239, 1215-1220 (1964)

KORANSKY, W. — unveröffentlichte Versuche.

KORANSKY, W. — Trennung und Bestimmung der Nucleotide des Gehirns. Naunyn-Schmiedebergs Arch.exp. Path. 234, 46-65 (1958)

KORANSKY, W. — Die freien Nucleotide des Gehirns bei verschiedenen Funktionszuständen. Habilitationsschrift an der Freien Universität Berlin (1958)

KORNBERG, A. and W.E. PRICER jr. — Di- and Triphosphopyridine Nucleotide Isocitric Dehydrogenases in Yeast. J.Biol.Chem. 189, 123-136 (1951)

LOTSPEICH, W.D. and R.A. PETERS — The action of Sulfhydryl Inhibitors upon isocitric Dehydrogenase with special Reference to the Behaviour of some Trivalent Arsenicals. Biochem.J. 49, 704-709 (1951)

MAIBAUER, D. und H. HERKEN — Vorkommen und Anreicherung von Inosit und Inositderivaten in den Zellfraktionen von Gehirn und Leber. Naunyn-Schmiedebergs Arch.exp. Path. 227, 456-466 (1956)

MARKHAM, R. and J.D. SMITH — Chromatographic Studies of Nucleic Acids. 4. The Nucleic Acid of the Turnip Yellow Mosaic Virus: Including Note on the Nucleic Acid of the Tomato Bushy Stunt Virus. Biochem.J. 49, 401-406 (1951)

MARTIUS, C. and F. LYNEN — Probleme des Citronensäurecyklus. Advances in Enzymol 10, 167-222 (1950)

56. MOYLE, J. and M. DIXON
Purification of the isocitric Enzyme (Triphosphopyridine Nucle tide Linked isocitric Dehydroge Oxalsuccinic Carboxylase).
Biochem.J. 63, 548-552 (1956)

57. MOYLE, J.
Some Properties of Purified isocitric Enzyme.
Biochem.J. 63, 552-558 (1956)

58. NEUHOFF, V.
Mikromethode zur Bestimmung von APAD und 3-AP.
Naunyn-Schmiedebergs Arch.exp. Path. 245, 49-50 (1963)

59. NEUHOFF, V. und T. HARRIS
Isolierung und Identifizierung v Metaboliten des 3-AP.
Naunyn-Schmiedebergs Arch.exp. Path. 249, 11-20 (1964)

60. NÜRNBERG, E.
Zur Dünnschichtchromatographie auf dem Vitamingebiet.
Dtsch.Apoth.Ztg. 101, 268-269 (1961)

61. PASTUSKA, G. und H. TRINKS
Die Dünnschichtelektrophorese und ihre Anwendung zur Trennung von Phenolen und Phenolcarbon-säuren.
Chemiker Ztg. 85, 535-538 (1961)

62. PASTUSKA, G. und H. TRINKS
Untersuchungen mit Hilfe der Dünnschichtelektrophorese.
Chemiker Ztg. 86, 135-138 (1962)

63. PLAUT, G. and S.C. SUNG
Diphosphopyridine Nucleotide Isocitric Dehydrogenase from Annimal Tissues.
J.Biol.Chem. 207, 305-314 (1954)

64. RANDERATH, K.
Dünnschichtchromatographie an Ionenaustauscherschichten. Trenn von Nucleinsäure-Derivaten.
Angewandte Chemie 73, 674-676 (1

65. RANDERATH, K. und H.J. STRUCK
Dünnschichtchromatographische Trennungen von Nucleinsäure-Derivaten an Celluloseschichten.
J.Chromatog. 6, 365-367 (1961)

66. SANWAL, B.D., M.W. ZINK and C.S. STACHOW
Nicotinamide Adenine Dinucleotid Spezific Dehydrogenase (A Possible Regulatory Protein).
J.Biol.Chem. 239, 1597-1603 (1964)

67. SPEYER, J.F. and S.R. DICKMAN
On the Mechanism of Action of Aconitase.
J.Biol.Chem. 220, 193-208 (1956)

68. SIEBERT, G., J. DUBUC, R.C. WARNER and G.W.E. PLAUT
The Preparation of Isocitricdehydrogenase from Mammalian Heart.
J.Biol.Chem. 226, 965-975 (1957)

69. SIEBERT, G. M. CARSIOTIS and G.W.E. PLAUT
The Enzymatic Properties of Isocitricdehydrogenase.
J.Biol.Chem. 226, 977-991 (1957)

70. STAHL, E.
Dünnschichtchromatographie.
Ein Laboratoriumshandbuch.
Springer-Verlag
Berlin, Göttingen, Heidelberg

71. THIERFELDER und DAIBER
Zur Kenntnis des Verhaltens tettaromatischer Ketone im Tierkörper.
Z.Physiol.Chem. 130, 380-396 (1923)

72. WARBURG, O. und W. CHRISTIAN
Über Aktivierung der Robinsonschen Hexose-Mono-Phosphorsäure in roten Blutzellen und die Gewinnung aktivierender Fermentlösungen.
Biochem.Z. 242, 206-227 (1931)

73. WARBURG, O., W. CHRISTIAN und A. GRIESE
Wasserstoffübertragendes Co-Ferment, seine Zusammensetzung und Wirkungsweise.
Biochem.Z. 282, 157-205 (1935)

74. WARBURG, O. und W. CHRISTIAN — Zerstörung des wasserstoffübertragenden Co-Fermentes durch ultraviolettes Licht. Biochem.Z. 282, 221-223 (1935)

75. WARBURG, O. und W. CHRISTIAN — Pyridin, der wasserstoffübertragende Bestandteil von Gärungsfermenten. (Pyridin-Nucleotide) Biochem.Z. 287, 291-328 (1936)

76. WOOLLEY,D.W., F.M. STRONG, R.J. MADDEN — Anti-Black Tongue Activity of Various Pyridine Derivatives. J.Biol.Chem. 124, 715-723 (1938)

77. WOOLLEY,D.W. and A.G.C. WHITE — Attempts to Produce Vitamine Deficiency Diseases by Feeding Compounds Related Structurally to Vitamins. Proc.Soc.Exp.Biol. 52, 106-108 (1943)

78. WOOLLEY,D.W. — Production of Nicotinic Acid Deficiency with 3-Acetylpyridine the Ketone Analogue of Nicotine Acid. J.Biol.Chem. 157, 455-459 (1946)

Meinen verehrten Lehrern, Herrn Professor Dr. med. Helmut Selbach und Herrn Privatdozenten Dr. med. Karl Kanig, danke ich vielmals für die Überlassung des Themas und die Einführung in die neurochemische Forschung sowie für die hilfreiche Anleitung und die freundliche Unterstützung bei der Ausführung dieser Arbeit.

Herrn Professor Dr. med. Wolfgang Koransky bin ich zu grossem Dank verpflichtet für die mir gewährte Arbeitsmöglichkeit in der Isotopenabteilung des Pharmakologischen Institutes (Direktor: Prof. Dr. med. Hans Herken) und für den mir vielfach erteilten Rat.

Den Mitarbeitern unserer Abteilung, Frau Sieglinde Kluwe, Fräulein Ursula Brandt, Fräulein Christa Wiere und Herrn Wilhelm Haase, sage ich herzlichen Dank für die grosse Hilfe, die sie mir stets angedeihen liessen.

L e b e n s l a u f

Am 1.7.1940 wurde ich, Werner Oesterle, als erstes Kind des Pfarrers Siegfried Oetserle und seiner Ehefrau Lieselotte, geb. Mayer, in Stuttgart geboren. 1945 wurde mein Vater aus Frankreich als vermisst gemeldet.

Die Grundschule besuchte ich von 1947 - 1950 in Mehrstetten (Württemberg).

Nach dem Besuch des Dillmann-Gymnasiums in Stuttgart und der 1959 bestandenen Reifeprüfung begann ich an der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen mit dem Medizinstudium

Nach sieben Semestern in Tübingen setzte ich mein Studium an der Freien Universität Berlin fort, wo ich am 1.April 1965 das Staatsexamen bestand.

Die ersten zehn Monate meiner Medizinalassistentenzeit war ich in der Neurochemischen Abteilung der Psychiatrischen und Neurologischen Klinik der Freien Universität Berlin tätig. Dort hatte ich im Frühjahr 1963 mit meiner Doktorarbeit begonnen. Eine anderer Promotionsversuch wurde nicht unternommen.